

II

(Retsakter hvis offentliggørelse ikke er obligatorisk)

KOMMISSIONEN

KOMMISSIONENS DIREKTIV

af 18. november 1987

om niende tilpasning til den tekniske udvikling af Rådets direktiv 67/548/EØF om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer

(87/302/EØF)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE
FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til Traktaten om Oprettelse af Det Europæiske Økonomiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 67/548/EØF af 27. juni 1967 om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer ⁽¹⁾, ændret for sjette gang ved direktiv 79/831/EØF ⁽²⁾, særlig artikel 19, og

ud fra følgende betragtninger:

I artikel 3, stk. 1, i direktiv 67/548/EØF er det fastsat, at bestemmelsen af stoffernes og præparaternes fysisk-kemiske egenskaber, deres toksicitet og deres økotoxicitet foretages efter de metoder, der er fastlagt i bilag V;

i artikel 3, stk. 2, i direktiv 67/548/EØF er det fastsat, at vurderingen af faren ved et stof eller præparat for miljøet, også hvis den kun en potentiel, foretages på grundlag af de i bilag VII og VIII anførte karakteristika;

bilag V, som affattet ved Kommissionens direktiv 84/449/EØF ⁽³⁾, indeholder for øjeblikket kun de undersøgelsesmetoder, der svarer til de karakteristika, der er anført i bilag VII, og det er derfor nødvendigt også at stille undersøgelsesmetoder til rådighed, der svarer til de karakteristika, der er anført i bilag VIII;

bestemmelserne i dette direktiv er i overensstemmelse med udtalelse fra Udvalget for tilpasning til den tekniske udvik-

ling af direktiverne om fjernelse af tekniske hindringer for samhandelen med farlige stoffer og præparater —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

Artikel 1

I bilag V til direktiv 67/548/EØF indsættes bilaget til nærværende direktiv.

Artikel 2

Medlemsstaterne vedtager og offentliggør inden den 31. december 1988 de bestemmelser, der er nødvendige for at efterkomme dette direktiv. De underretter straks Kommissionen herom. Medlemsstaterne anvender disse bestemmelser senest fra den 30. juni 1989.

Artikel 3

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 18. november 1987.

På Kommissionens vegne

Stanley CLINTON DAVIS

Medlem af Kommissionen

⁽¹⁾ EFT nr. 196 af 16. 8. 1967, s. 1.

⁽²⁾ EFT nr. L 259 af 15. 10. 1979, s. 10.

⁽³⁾ EFT nr. L 251 af 19. 9. 1984, s. 1.

BILAG

De herunder beskrevne undersøgelsesmetoder er metoder til bestemmelse af visse af de toksikologiske og økotoxikologiske egenskaber, der er opregnet i bilag VIII til Rådets direktiv 79/831/EØF. Der er beskrevet undersøgelsesmetoder, som er egnede til niveau 1 og niveau 2 i bilag VIII, men undersøgelserne er ikke udspecificeret efter niveau.

INDHOLD

	Side
AFNSIT B: Metoder til bestemmelse af toksicitet	4
Generel indledning: Afsnit B	4
Subkronisk toksicitet, oral indgift: 90 dages gentagen oral indgift til gnavere	8
Subkronisk toksicitet, oral indgift: 90 dages gentagen oral indgift under anvendelse af andre dyrearter end gnavere	12
Subkronisk toksicitet, optagelse gennem huden: 90.dages gentagen dosering på hud under anvendelse af gnavere	16
Subkronisk toksicitet, inhalation: 90 dages gentagen inhalation under anvendelse af gnavere	20
Teratogenicitetsundersøgelse i gnavere og ikke-gnavere	24
Undersøgelse af kronisk toksicitet	27
Karcinogenicitetsundersøgelse	32
Kombineret undersøgelse af karcinogenicitet/kronisk toksicitet	37
Reproduktionstoksicitetsundersøgelse i en generation	43
Reproduktionstoksicitetsundersøgelse i to generationer	47
Toksikokinetik	51
Mutagenicitetstestning og screening for karcinogenicitet	55
— Genmutation — <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
— Mitotisk rekombination — <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
— Genmutationstest — pattedyrceller in vitro	61
— DNA-skade og DNA-reparation — Unscheduled DNA synthesis — pattedyrceller in vitro	64
— Søsterkromatid ombytning (SCE) in vitro	68
— Kønsbundet recessiv letal test — <i>Drosophila melanogaster</i>	71
— Celletransformationstest — pattedyrceller in vitro	73
— Dominant letal test — gnaver	76
— Cytogenetisk test — kønsceller fra pattedyr	79
— Spøttest — mus	82
— Arvelig translokation hos mus	85
Afsnit C: Metoder til bestemmelse af økotoksicitet	88
Generel indledning: Afsnit C	88
Alger — Væksthæmningstest	89
Toksicitet for regnorme — Test i syntetisk jord	95
Biologisk nedbrydning: Zahn-Wellens test	99
Biologisk nedbrydning: Aktiveret Slam — Simulationstest	106
Biologisk nedbrydning: Aktiveret Slam — Respirationshæmningstest	118
Biologisk nedbrydning: Modifieret SCAS-test	123

AFSNIT B: METODER TIL BESTEMMELSE AF TOKSICITET**GENEREL INDLEDNING: AFSNIT B****LANGTIDSUNDERSØGELSER**

undersøgelse af subkronisk/kronisk toksicitet og karcinogenicitet

Beskrivelse af teststof og testblanding

Teststoffets sammensætning, herunder de vigtigste urenheder og dets relevante fysisk-kemiske egenskaber, herunder dets stabilitet skal være kendt forud for enhver undersøgelse af toksicitet.

Teststoffets fysisk-kemiske egenskaber giver en række vigtige oplysninger i forbindelse med valget af den måde, hvorpå stoffet administreres, og udformningen af undersøgelser af subkronisk og kronisk toksicitet eller karcinogenicitet samt håndtering og opbevaring af teststoffet.

Oplysninger om den kemiske struktur og de fysisk-kemiske egenskaber kan også indicere, hvorledes absorptionen kan foregå, når der vælges en bestemt fremgangsmåde at administrere stoffet på, og de kan give oplysning om stoffets skæbne i stofskifteprocesser og i fordeling i væv. Der kan også foreligge oplysninger om toksikokinetiske parametre fra tidligere undersøgelser af toksicitet og toksikokinetik.

Forud for undersøgelsen bør der udvikles en analysemetode til kvalitativ og kvantitativ bestemmelse af teststoffet (herunder vigtige urenheder, såfremt dette er muligt) i doseringsmediet og i biologisk materiale.

Forsøgsdyr: valg af art og stamme

Da disse undersøgelser omfatter størstedelen af dyrenes levetid, er der en tendens til at begrænse sig til forsøgsdyrearter, som er lette at holde, og som har en relativ kort levetid. Det er særdeles ønskeligt, at man kender den spontane sygdoms- og tumorincidens i dyrestammen, når den holdes under omstændigheder, der svarer til forsøgsbetingelserne.

Stammerne skal være velbeskrevne, og der må ikke forekomme interfererende kongenitte defekter. Anvendelsen af indavlede stammer eller F₁ hybrider kan i denne forbindelse være forbundet med visse fordele. Når der foreligger tilstrækkelige baggrundsdata om udavlede stammer, og man anvender dyr fra lukkede stammer, kan disse dyr accepteres.

Dyrepasning, fodring og vanding

Dyreforsøg og -undersøgelser skal udføres i overensstemmelse med de nationale bestemmelser og bør tage hensyn til humane principper og den internationale udvikling i spørgsmålet om dyrenes velbefindende.

Såfremt der skal opnås meningsfulde resultater, er det absolut påkrævet, at dyrenes miljø underkastes en stringent kontrol, og at der anvendes egnede dyrepasningsteknikker. Faktorer som miljøbetingelser, interkurrente sygdomme, medikamentel terapi, urenheder i foderet, luften, vandet eller strøelsen og de almindelige dyrepasningsfaciliteter kan have en signifikant betydning for resultatet af studier med gentagen dosering. Kemiske steriliseringsagensers betydning for undersøgelsen bør i almindelighed være kendt.

Foderet skal opfylde alle de ernæringsmæssige krav, forsøgsdyrearten stiller og jævnlige kontrolleres. Det bør være fri for urenheder, som kan indvirke på forsøgsresultaterne. Leverandøren skal levere analysedata med hver batch til laboratoriet, som anvender foderet. Gnavere bør fodres og vandes ad libitum, og foderet bør fornyes mindst en gang om ugen. Der anvendes i øjeblikket tre forskellige former for foder: konventionelt, syntetisk og forskellige former for foder med oplyst sammensætning.

Uanset hvilken form for foder, der vælges, må leverandørerne ved regelmæssig kontrol dokumentere grundfoderets ernæringsværdi og indholdet af forurenninger, og disse oplysninger skal videregives til laboratoriet med hver enkelt sending foder. Det er overordentlig ønskeligt, at man på forhånd kender fodersammensættningens betydning for stofskiftet, udvikling af tumorer og dyrenes levetid.

Forsøgslaboratoriet kan yderligere foretage stikprøveanalyser af grundfoderet både med henblik på at analysere foderets komponenter og forurenninger herunder karcinogener, som uforvarende er tilsat foderet. I så tilfælde bør analyseresultaterne opbevares og inkluderes i den afsluttende rapportering om hvert enkelt teststof.

Almindelige foderkomponenter, som vides at influere på karcinogenesen (f.eks. antioksidanter, umættede fedtsyrer, selen), bør ikke være til stede i interfererende koncentrationer. En række forureninger, der normalt forekommer i foderet, kan muligvis have betydning for vurderingen af karcinogeniciteten, og det er derfor nødvendigt at være særlig opmærksom på, om der i foderet forekommer pesticidrester, organiske klorforbindelser og polycykliske aromatiske kulbrinter, østrogener, tungmetaller, nitrosaminer og mykotoksiner.

Når teststoffet indgives gennem vand eller foder, er det væsentligt at kende dets stabilitet. Forud for toksikologiske testserier bør der gennemføres passende stabilitets- og homogenitetstests med henblik på at bestemme hyppigheden af fodertilberedning og kontrol.

Når foderet steriliseres, bør virkningen af sådanne fremgangsmåder på teststoffet og foderkomponenterne være kendt. Er der behov for tilpasninger, bør disse gennemføres.

Ved karcinogenicitetstest bør forskerne være opmærksomme på eventuelle forureninger i det anvendte vand. Vand, der er godkendt som drikkevand, er normalt velegnet, og der bør være adgang til oplysninger om dets sammensætning.

Det kan være nødvendigt at ændre teststoffets koncentration i foderet, når dyrene vokser, for at holde forholdet mellem indtagelse af teststof og kropsvægt nogenlunde konstant.

Næringsværdien af forsøgsgruppens foder bør ligge så tæt som muligt på kontrolgruppens foder. Det er derfor nødvendigt at tage næringsværdien af et teststof i foderblandingen i betragtning. Erfaringen viser, at et indhold af ikke-nærende substanser i foderet på op til 5 % sandsynligvis er uden betydning for foderets næringsværdi.

1. Inhalationsundersøgelser

Her er ikke specificeret grænsetests, fordi man ikke har fundet det muligt at definere en enkelt grænseværdi for eksponering ved inhalation.

2. Teratogenicitetsundersøgelse

Testmetoden er primært beregnet på oral indgift. Andre måder kan anvendes afhængigt af teststoffets fysiske egenskaber eller sandsynlige humane eksponeringsformer. I sådanne tilfælde bør testmetoden tilpasses under hensyntagen til de relevante elementer i 28 dages undersøgelserne.

3. Toksikokinetik

Toksikokinetiske undersøgelser er en hjælp til fortolkning og vurdering af toksicitetsdata. Formålet med disse undersøgelser er at belyse særlige aspekter af den testede kemiske forbindelses toksiske virkning, og undersøgelsesresultaterne kan være til støtte ved udformning af yderligere toksikologiske undersøgelser. Det er ikke hensigten med disse undersøgelser i alle tilfælde at bestemme alle parametre. Kun i sjældne tilfælde vil det være nødvendigt at gennemføre hele rækken af toksikokinetiske undersøgelser (absorption, udskillelse, distribution og stofskifte). For en række kemiske forbindelses vedkommende kan det være tilrådeligt at ændre denne rækkefølge, og det vil i nogle tilfælde være tilstrækkeligt at teste en enkelt dosis (»grænsetest«).

Definitioner

- toksikokinetik: undersøgelsen af teststoffers absorption, distribution, stofskifte og udskillelse
- absorption: den (eller de) proces(ser), hvorved et teststof trænger ind i kroppen
- udskillelse: den (eller de) proces(ser), hvorved et teststof og/eller dets stofskifteprodukter udskilles af kroppen
- distribution: den (eller de) proces(ser), hvorved det absorberede teststof og/eller dets stofskifteprodukter cirkulerer i og udskilles fra forskellige organer og væv i kroppen
- stofskifte: den (eller de) proces(ser), der forårsager strukturelle ændringer i teststoffet i kroppen enten ved enzymatiske eller non-enzymatiske reaktioner.

4. Akut og subakut toksicitet under anvendelse af en anden dyreart

Formålet med at foretage en undersøgelse, hvori der anvendes en anden dyreart, er at supplere de konklusioner, der kunne udledes på grundlag af den først anvendte dyreart.

Når der foretages en sådan undersøgelse, kan den allerede beskrevne forsøgsmetode anvendes, evt. tilpasset et mindre antal dyr.

5. Fertilitetsundersøgelse

Hvis der er behov for en reproduktionsundersøgelse i tre generationer, kan den beskrevne metode for reproduktionsundersøgelse i to generationer udvides til at dække en tredje generation.

6. Mutagenicitetstests

Supplerende mutagenicitetstests, herunder screening for kræftfremkaldende virkning

I direktivets bilag VIII er der omtalt supplerende undersøgelser af mutagenicitet og forscreening af kræftfremkaldende virkning. De undersøgelser, der nævnes i dette afsnit, kan i almindelighed anvendes på begge aspekter.

Indledning

Den første vurdering af et stofs mutagene aktivitet foretages ved at måle fremkaldelsen af gen(punkt)mutationer i bakterier og cytogenetiske skader i pattedyrceller (in vitro eller in vivo); egnede metoder til disse basisundersøgelser er beskrevet tidligere. Dette afsnit berører yderligere undersøgelser, der egner sig til verifikation og/eller supplerer af basisundersøgelsesresultater. Disse undersøgelser kan bruges til en række forskellige formål:

1. Bekræftelse af de resultater, der er opnået i basisundersøgelserne
2. Undersøgelse af genetiske endpoints, der ikke er undersøgt i basisundersøgelserne
3. Påbegyndelse eller supplerer af in-vivo-undersøgelser.

Derfor omfatter de beskrevne tests både in vitro og in vivo eukaryotiske systemer samt en udvidet række biologiske endpoints. Testene giver oplysning om punktmutationer i organismer, der er mere komplekse end de bakterier, som bruges i basisundersøgelserne, og giver flere oplysninger om et stofs evne til at inducere kromosomforandringer. Også testning af andre endpoints end mutationer og kromosomforandringer er nævnt. Disse tests giver supplerende oplysninger og egner sig til brug i testsystemer.

Når man planlægger et supplerende program til undersøgelse af mutagen effekt, bør det udformes således, at det giver relevant yderligere viden om det pågældende stofs mutagene og/eller karcinogene potentiale.

Hvilke undersøgelser, der er hensigtsmæssige i et konkret tilfælde, afhænger af talrige faktorer, herunder også stoffets kemiske og fysiske egenskaber, resultaterne af de indledende bakteriologiske og cytogenetiske tests, stoffets omsætning og indflydelse på stofskifteprocesserne, resultaterne af andre toksikologiske undersøgelser og den eksisterende viden om stoffets anvendelse. Valget af tests bør derfor, i betragtning af de varierende faktorer, der skal tages hensyn til, ikke underlægges et stramt skema. Dog kan nogle generelle principper bruges som vejledning. Hvis en test gav positivt resultat i basisundersøgelsen, bør de supplerende undersøgelser omfatte mindst en test, der kan påvise det samme genetiske endpoint. Hvis testningen for såvel genmutationer som kromosomforandringer gav negativt resultat i basisundersøgelsen, bør begge disse elementer normalt gøres til genstand for supplerende undersøgelser. Det kan ligeledes være hensigtsmæssigt at skaffe yderligere data fra indikatorundersøgelserne (som er anført nedenfor).

Metoderne til sådanne undersøgelser er anført nedenfor i grupper svarende til deres vigtigste genetiske endpoint.

Undersøgelser af gen(punkt)mutationer

De følgende tests kan være velegnede til supplerende undersøgelse af et stofs mulige evne til at fremkalde gen(punkt)mutationer:

- a) Fremad- eller tilbagemutationsundersøgelser med anvendelse af eukaryotiske mikroorganismer *Saccharomyces cerevisiae*
- b) In vitro undersøgelser af fremadmutation i pattedyrceller
- c) Den kønsbundne recessive letale test i *Drosophila melanogaster*
- d) In vivo somatisk celledomutationstest: spottest i mus.

Undersøgelser af kromosomforandringer

De følgende tests kan være velegnede til supplerende undersøgelse af et stofs mulige evne til at fremkalde kromosomforandringer:

- a) In vivo cytogenetiske undersøgelser i pattedyr
Det bør overvejes at foretage in vivo metafaseanalyser af benmarvceller, hvis ikke de er foretaget i den indledende vurdering (basisundersøgelsen). Endvidere kan in vivo cytogenetiske undersøgelser af kønsceller inddrages

- b) In vitro cytogenetiske undersøgelser i pattedyrceller, hvis ikke de er foretaget i den indledende vurdering
- c) Dominant letal test i gnavere
- d) Arvelig translokation hos mus.

Indikatortests af virkningen på DNA

Der findes metoder, hvorved man kan konstatere visse virkninger på DNA uden dog at kunne konstatere en mutagen virkning som »endpoint«. Disse undersøgelser kan give oplysninger, der supplerer resultaterne af mutagenicitetsundersøgelserne, og som kan være nyttige i tolkningen af sådanne undersøgelser. De følgende tests med anvendelse af eukaryotiske mikroorganismer eller pattedyrceller kan være velegnede, når der er behov for sådanne undersøgelser:

- a) Mitotisk rekombination i *Saccharomyces cerevisiae*
- b) DNA-skade og DNA-reparation — unscheduled DNA synthesis i pattedyrceller (in vitro)
- c) Søsterkromatidombytning i pattedyrceller (in vitro).

Andre indikatortests til konstatering af kræftfremkaldende potentiale

Der findes bestemmelser af pattedyrcellers transformation, som måler et stofs evne til at fremkalde morfologiske og adfærdsmæssige forandringer i cellekulturer, der menes at være forbundet med maligne transformationer in vivo. Der kan bruges en række forskellige celletyper og transformationskriterier.

Beregning af risici for arvelige effekter i pattedyr

Der findes metoder til måling af arvelig effekt i intakte pattedyr. Denne effekt kan være frembragt af gen(punkt)mutationer som i specifik locus test med anvendelse af mus ⁽¹⁾ eller af kromosomforandringer som i arvelig translokationstest i mus.

Sådanne metoder kan anvendes ved vurderingen af den eventuelle humangenetiske risiko, der er forbundet med et stof. I betragtning af disse undersøgelser komplekse karakter og af det meget store antal dyr, der er behov for, især til specifik locus test, er det nødvendigt med en vægtig begrundelse, inden disse undersøgelser gennemføres.

⁽¹⁾ Specifik locus test med anvendelse af mus (som ikke er beskrevet i dette dokument) kan anvendes til afsløring af mutationer hos første generation efter eksponering af forældrenes kønsceller for et mutagent stof. Genetiske forandringer, der fører til arvelige ændringer med synlige fænotypiske udslag, kan afsløres og kvantificeres.

SUBKRONISK TOKSICITET, ORAL INDGIFT
90 DAGES GENTAGEN ORAL INDGIFT TIL GNAVERE

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Teststoffet indgives dagligt oralt i graduerede doser til et antal grupper af forsøgsdyr. Der gives en dosis pr. gruppe gennem en periode på 90 dage. Dyrene observeres dagligt i doseringsperioden. Eventuelle tegn på toksicitet registreres. Dyr, der dør under forsøget eller aflives ved afslutningen af forsøget, obduceres.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Dyrene holdes under forsøgsbetingelserne med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage inden forsøget påbegyndes. Unge, sunde, kønsmodne dyr fordeles randomiseret i test- og kontrolgrupper.

Teststoffet kan indgives med foderet, med mavesonde, i kapsler eller i drikkevandet. Alle dyr bør underkastes samme administrationsform i hele forsøgsperioden. Hvis der anvendes et vehikel eller andre tilsætningsstoffer med henblik på at lette doseringen, skal det være vist, at de ikke har nogen toksisk virkning. Her kan tidligere opsamlede data benyttes.

Forsøgsbetingelser

Forsøgsdyr

Rotten er det foretrukne forsøgsdyr, medmindre der foreligger kontraindikationer. Der benyttes unge, sunde rotter af almindeligt anvendte laboratoriestammer, og indgivelsen bør ideelt set indledes, inden rotterne er seks uger, og under alle omstændigheder inden de er otte uger gamle. Ved forsøgets begyndelse må vægten af de anvendte dyr ikke variere mere end $\pm 20\%$ af gennemsnitsvægten. Hvis en undersøgelse af subkronisk toksicitet ved oral indgift udføres som et forstudium til en langtidsundersøgelse, skal samme dyreart og stamme anvendes i begge undersøgelser.

Antal og køn

Der anvendes mindst 20 dyr (ti hun- og ti handyr) til hver dosisniveau. Hundyrerne må ikke have født og må ikke være drægtige. 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. Man kan samtidig indgive en satellitgruppe på 20 dyr (ti af hvert køn) den højeste dosis gennem 90 dage og observere, hvorvidt toksiske virkninger er reversible, persisterende eller indtræder forsinket i en periode på 28 dage efter forsøget.

Dosisniveauer

Der skal anvendes mindst tre dosisniveauer samt en kontrolgruppe. Dyrene i kontrolgruppen behandles nøjagtigt som dyrene i forsøgsgrupperne bortset fra indgift af teststoffet. Hvis der anvendes et vehikel til at lette doseringen, bør kontrolgruppen indgives vehiklet på samme måde som forsøgsgruppen, og den bør indgives samme mængde vehikel som den forsøgsgruppe, der modtager den højeste dosis. Den højeste dosis bør have toksisk effekt, men ikke forårsage dødelighed eller kun en meget begrænset dødelighed. Det laveste dosisniveau bør ikke have nogen toksisk effekt overhovedet.

Hvis der foreligger en anvendelig vurdering af menneskers eksponering for stoffet, bør det laveste dosisniveau overskride denne eksponering. Ideelt set bør middeldosis frembringe de mindste observerbare toksiske effekter. Hvis der anvendes mere end en middeldosis, bør de vælges således, at der opnås graduering af de toksiske virkninger.

I den lavt doserede og middeldoserede gruppe og i kontrolgruppen bør dødeligheden holdes på et lavt niveau for at give mulighed for en meningsfuld vurdering af resultaterne.

Hvis teststoffet indgives med foderet, kan man enten anvende en konstant koncentration (ppm eller mg/kg foder) eller en konstant dosering i forhold til dyrenes vægt. Det benyttede alternativ specificeres. Hvis teststoffet indgives med mavesonde, bør doseringen finde sted på samme tidspunkt hver dag. Doserne bør justeres med jævne mellemrum (hver eller hveranden uge), for at dosis kan være konstant i forhold til dyrenes legemsvægt.

Grænsetest

Hvis der ikke i et 90 dages forsøg, udført efter nedenstående retningslinjer, kan konstateres toksisk virkning af en dosis på 1 000 mg/kg legemsvægt/dag eller de større dosis fastsat ud fra kendskabet til den eventuelle eksponering, mennesker udsættes for, kan yderligere testning betragtes som unødvendig. Det er vigtigt at sikre sig, at stoffer med lav toksicitet, som indgives med foderet, ikke på grund af deres mængde eller andre egenskaber griber ind i ernæringsmæssige krav.

Observationsperiode

Alle dyr observeres dagligt, og det registreres, om der optræder tegn på toksicitet, hvornår disse tegn optræder første gang, hvor længe de varer, og hvor kraftige de er. Dødstidspunkt og toksicitetstegnens optræden og forsvinden bør registreres.

Fremgangsmåde

Den ideelle dosering er, at dyrene indgives teststoffet syv dage om ugen i en periode på 90 dage. En eventuel satellitgruppe beregnet til efterfølgende observationer bør holdes under observation i yderligere 28 dage, uden indgift af teststof, således at man har mulighed for at registrere, om toksiske virkninger forsvinder eller om de persisterer.

Inspektion af dyrene skal omfatte forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønstret. Der holdes ugentligt regnskab med foderindtagelsen (og vandforbruget hvis teststoffet indgives via drikkevandet). Dyrene vejes een gang om ugen.

Dyrene observeres med jævne mellemrum for at det mindst mulige antal dyr går tabt for undersøgelsen på grund af f.eks. kannibalisme, autolyse af væv eller forveksling. Ved forsøgets afslutning aflives og obduceres dyrene med undtagelse af satellitgruppen. Døende dyr bør fjernes og obduceres, så snart de registreres.

Ved forsøgets afslutning skal alle dyr inklusive kontrolgruppen almindeligvis underkastes følgende undersøgelser:

- a) Oftalmologisk undersøgelse med anvendelse af et oftalmoskop eller lignende passende udstyr skal foretages inden indgift af teststoffet og ved undersøgelsens afslutning. Det må foretrækkes, at alle dyr undersøges, men sker det ikke, undersøges mindst gruppen på højeste dosisniveau og kontrolgruppen. Hvis der observeres forandringer i øjnene skal alle dyr undersøges.
- b) Hæmatologisk undersøgelse omfattende hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, erytrocyttælling, total og differential leukocyttælling. Måling af koaguleringssevne f.eks. koagulationstid, protrombintid, tromboplastintid, eller blodpladetælling skal foretages ved forsøgets afslutning.
- c) Klinisk-biokemisk analyse af blod skal foretages ved afslutningen af forsøget. Relevante analyseområder for alle forsøg er elektrolytbalance, kulhydratstofskifte, lever- og nyrefunktion. Valg af specifikke tests afhænger af observationer af teststoffets virkning. Følgende bestemmelser kan foreslås: kalcium, fosfor, klorid, natrium,

kalium, fasteglukose (fasteperioden vil afhænge af dyrearten), serum alanin aminotransferase (ALAT), serum aspartat aminotransferase (ACAT), ornitin decarboxylase, gamma glutamyl transpeptidase, urinstof, albumin, kreatinin, total bilirubin og total serumprotein. Andre bestemmelser, der kan være påkrævede i en adækvat toksikologisk vurdering, omfatter lipidanalyser, hormonanalyser, syre/basebalance, methæmoglobin, cholinesteraseaktivitet. Der kan anvendes yderligere klinisk-biokemisk analyse, hvor det skønnes nødvendigt for en videre undersøgelse af de observerede virkninger.

- d) Rutinemæssig urinalyse er ikke påkrævet, medmindre den indiceres af forventede eller observerede toksiske virkninger.

Hvis tidligere opsamlede basaldata er inadækvate, bør man gøre sig overvejelser over undersøgelse af hæmatologiske og klinisk biokemiske parametre, inden forsøget begynder.

Makroskopisk undersøgelse

Alle forsøgsdyrene skal underkastes en fuldstændig makroskopisk vurdering, der omfatter undersøgelse af kropsoverflader, alle kropsåbninger og kranie-, thorax-, og abdominalhulerne og deres indhold. Lever, nyrer, binyrer og testikler vejes så hurtigt som mulig efter dissektionen for at undgå udtørring. Følgende væv og organer skal opbevares i et passende medium med henblik på mulig senere histopatologisk undersøgelse: alle væv og organer, som udviser læsioner, hjerne, herunder snit af medulla/pons, den cerebellare og cerebrale cortex, hypofyse, skjoldbrusk/biskjoldbruskkirtel, thymusvæv, lunger, hjerte, aorta, (spytktler), lever, milt, nyrer, binyrer, bugspytkirtel, kønskirtler, uterus, (assessoriske kønskirtler), (hud), spiserør, mavesæk, duodenum, jejunum, ileum, coecum, tyktarm, endetarm, urinblære, en repræsentativ lymfeknude, (kvindelig brystkirtel), (lårmuskulatur), perifer nerve, sternum med knoglemarv, (øjne), (femur inklusive ledflade), (rygmarv i tre forskellige snit — cervikalt, midt for thorax og lumbalt) og (exorbitale tårekirtler).

(Væv, der er nævnt i parentes, behøver kun undersøges, hvis der er tale om toksicitetstegn eller kan sættes i forbindelse med målorganer).

Histopatologisk undersøgelse

- a) Der skal foretages en fuldstændig histopatologisk undersøgelse af organer og væv fra dyrene i kontrolgruppen samt i den gruppe, der har fået indgivet den højeste dosis.
- b) Alle alvorlige læsioner skal undersøges.
- c) Målorganer skal også undersøges i øvrige doserede grupper.
- d) Lungerne fra dyr i den lavest doserede og de middeldoserede grupper skal underkastes histopatologisk undersøgelse med henblik på konstatering af tegn på infektion, idet dette giver en egnet vurdering af dyrenes helbredstilstand. Man bør også underkaste lever og nyre fra dyr i disse grupper histopatologisk undersøgelse. Der er ikke rutinemæssigt behov for yderligere histopatologiske undersøgelser af dyr fra disse grupper, men organer, som viser tegn på læsioner i den gruppe, der har fået indgivet den højeste dosis, skal altid undersøges.
- e) Dyrene i en eventuel satellitgruppe bør underkastes en histopatologisk undersøgelse af væv og organer, der har vist toksisk påvirkning i de øvrige grupper.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, antal dyr med læsioner, og for hver type af læsioner den procentdel dyr, der udviser den pågældende læsion. Evaluering af resultaterne skal baseres på en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- dyreart, stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.
- forsøgsbetingelser
- dosisniveauer (med angivelse af vehikel, hvor et sådant er anvendt) samt koncentrationer
- oplysninger om toksisk reaktion inddelt efter køn og dosis

- ikke toksisk dosis, hvis en sådan er konstateret
- dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse af forsøgsdyr til forsøgets slutning
- toksiske eller andre virkninger
- observationstidspunkt for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten
- data for foder og vægt
- oftalmologiske fund
- hæmatologiske undersøgelser og samtlige resultater
- klinisk biokemiske undersøgelser og samtlige resultater (herunder resultater af urinanalyse)
- obduktionsfund
- detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund
- eventuel statistisk behandling af resultaterne
- diskussion af resultaterne
- fortolkning af resultaterne.

3.2. **Vurdering og fortolkning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. **LITTERATURHENVISNINGER**

Se den generelle indledning til afsnit B.

SUBKRONISK TOKSICITET, ORAL INDGIFT**90 DAGES GENTAGEN ORAL INDGIFT UNDER ANVENDELSE AF ANDRE DYREARTER END GNAVERE****1. METODE****1.1. Indledning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Teststoffet indgives dagligt oralt i graduerede doser til grupper af forsøgsdyr (ikke-gnavere), idet der gives en dosis pr. gruppe gennem en periode på 90 dage. Dyrene observeres dagligt i doseringsperioden. Eventuelle tegn på toksicitet registreres. Dyr, der dør under forsøget eller aflives ved afslutningen af forsøget, obduceres.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden*Forberedelser*

Dyrene holdes under forsøgsbetingelserne med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Unge, sunde dyr fordeles randomiseret i test- og kontrolgrupper.

Teststoffet kan indgives med foderet eller i kapsler, hvis denne fremgangsmåde skønnes mere egnet. Også andre former for oral indgivelse kan anvendes. Alle dyr bør underkastes samme administrationsform i hele forsøgsperioden. Hvis der anvendes et vehikel eller andre tilsætningsstoffer for at lette doseringen, bør det være vist, at de ikke har nogen toksisk virkning. Her kan tidligere opsamlede data benyttes.

*Forsøgsbetingelser***Forsøgsdyr**

De almindeligst anvendte forsøgsdyr ud over gnavere er hunden, der helst skal være af veldefineret herkomst. Andre dyrearter kan også anvendes. Der benyttes unge, sunde dyr, og hvis man benytter hunde, bør doseringen ideelt set indledes, når de er fire til seks måneder gamle, og under alle omstændigheder inden de er ni måneder gamle. Hvis en undersøgelse af subkronisk toksicitet ved oral indgift udføres som et forstudium til en langtidsundersøgelse, bør samme dyreart/dyr af samme herkomst anvendes i begge undersøgelser.

Antal og køn

Der anvendes mindst otte dyr (fire hun- og fire handyr) til hvert dosisniveau. Antallet af overlevende dyr ved forsøgets slutning skal være tilstrækkelig stort til, at der kan foretages en meningsfuld vurdering af toksiske virkninger.

Dosisniveauer

Der skal anvendes mindst tre dosisniveauer samt en kontrolgruppe. Dyrene i kontrolgruppen behandles nøjagtigt som dyrene i forsøgsgrupperne bortset fra indgift af teststof. Den største dosis bør have toksisk effekt, men ikke forårsage dødsfald. Den mindste dosis bør ikke have nogen toksisk effekt overhovedet. Hvis der foreligger en

anvendelig vurdering af menneskers eksponering for stoffet, bør det laveste dosisniveau overskride denne eksponering. Ideelt set bør middeldosis frembringe mindst mulige observerbare toksiske effekter. Hvis der anvendes mere end en middeldosis, bør de vælges således, at der opnås graduering af de toksiske virkninger.

I den lavt doserede og de middeldoserede grupper og i kontrolgruppen bør der ikke være nogen dødsfald.

Det er vigtigt at sikre sig, at stoffer med lav toksicitet, som indgives med foderet, ikke på grund af deres mængde eller andre egenskaber griber ind i ernæringsmæssige krav.

Hvis teststoffet indgives med foderet, kan man enten anvende en konstant koncentration (ppm eller mg/kg foder) eller en konstant dosering i forhold til dyrenes vægt. Det benyttede alternativ specificeres. Hvis teststoffet indgives direkte f.eks. i kapsler, bør doseringen finde sted på samme tidspunkt hver dag, og doserne bør justeres en gang om ugen, for at dosis kan være konstant i forhold til dyrets legemsvægt. Hvis en undersøgelse af subkronisk toksicitet udføres som et forstudium til en langtidsundersøgelse, bør der anvendes samme foder i begge undersøgelser.

Grænsetest

Hvis der ikke i et 90 dages forsøg udført efter nedenstående retningslinjer kan konstateres toksisk virkning af en dosis på 1 000 mg/kg legemsvægt/dag eller en større dosis fastsat ud fra kendskabet til den eventuelle eksponering, menneskers udsættes for, kan yderligere testning betragtes som unødvendig. Det er vigtigt at sikre sig, at stoffer med lav toksicitet, som indgives med foderet, ikke på grund af deres mængde eller andre egenskaber griber ind i ernæringsmæssige krav.

Observationsperiode

Alle dyr observeres dagligt, og det registreres, om der optræder tegn på toksicitet, hvornår disse tegn optræder første gang, hvor længe de varer, og hvor kraftige de er. Dødstidspunkt og toksicitetstegn optræden og forsvinden bør registreres.

Fremgangsmåde

Den ideelle dosering er, at dyrene indgives teststoffet i syv dage om ugen i en periode på 90 dage. Ud fra praktiske overvejelser kan det imidlertid accepteres, at indgiften kun foregår fem dage om ugen, såfremt teststoffet indgives på anden måde end i foderet. Inspektion af dyrene skal omfatte, men ikke nødvendigvis indskrænkes til forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønstret. Der holdes ugentligt regnskab med foderindtagelsen (og vandforbruget hvis teststoffet indgives via drikkevandet). Dyrene vejes en gang om ugen.

Der foretages en omhyggelig klinisk undersøgelse af dyrene hver dag, og alle nødvendige skridt til sikring af, at det mindst mulige antal dyr falder uden for undersøgelsen, tages. Ved forsøgets afslutning obduceres alle overlevende dyr. Døende dyr skal fjernes og obduceres, så snart de registreres.

Følgende undersøgelser udføres normalt på alle dyr inklusive kontrolgruppen:

- a) Ophthalmologisk undersøgelse med anvendelse af oftalmoskop eller lignende passende udstyr bør foretages inden indgift af teststoffet og ved forsøgets afslutning. Det må foretrækkes, at alle dyr undersøges, men mindst gruppen på højeste dosisniveau og kontrolgrupperne. Hvis der observeres forandringer i øjnene, bør alle dyr undersøges.
- b) Hæmatologisk analyse omfattende hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, erytrocyttælling, total og differential leukocytælling og måling af koaguleringssevnen f.eks. koaguleringstid, protrombintid, tromboplastintid eller blodpladetælling bør foretages ved forsøgets begyndelse og enten en gang om måneden eller efter halvdelen af testperioden og endelig ved forsøgets afslutning.
- c) Ved forsøgets begyndelse skal der foretages klinisk biokemisk analyse på blod, og disse analyser bør gentages en gang om måneden eller efter halvdelen af testperioden og endelig ved forsøgets afslutning. Relevante analyseområder for alle forsøg er elektrolytbalance, kulhydratstofskifte, lever- og nyrefunktion. Valg af specifikke tests afhænger af observationer af teststoffets virkning. Bestemmelser, som kan foreslås, er kalcium, fosfor, klorid, natrium, kalium, fasteglukose (fasteperioden afhænger af dyrearten/dyrenes herkomst), serum alanin aminotransferase (ALAT), serum aspartat aminotransferase (ASAT), ornitin decarboxylase, gamma

glutamyl transpeptidase, urinstof, albumin, blodkreatinin, total bilirubin og total serumprotein. Andre bestemmelser, der kan være påkrævede i en adækvat toksikologisk vurdering, omfatter lipidanalyse, hormonanalyser, syre/basebalance, methæmoglobin, cholinesteraseinhibering. Der kan foretages yderligere klinisk biokemiske analyser, hvor det skønnes nødvendigt for en videre undersøgelse af de observerede virkninger. Ikke-gnavere bør faste (op til 24 timer), før der tages blodprøver.

- d) Rutinemæssig urinanalyse er ikke påkrævet, medmindre den indiceres af forventede eller observerede toksiske virkninger.

Makroskopisk undersøgelse

Alle forsøgsdyrene skal underkastes en fuld makroskopisk vurdering, der omfatter undersøgelse af kropsoverflade, alle kropsåbninger og kranie-, thorax- og abdominalhulene og deres indhold. Lever, nyrer, binyrer, skjoldbruskkirtel (med biskjoldbruskkirtler) og testikler bør vejes så hurtigt som muligt efter dissektionen for at undgå udtørring. Følgende væv og organer skal opbevares i et passende medium med henblik på mulig senere histopatologisk undersøgelse. Alle væv og organer, som udviser læsioner, hjerne, herunder snit af medulla/pons, den cerebellare og cerebrale cortex, hypofysen, skjoldbrusk/biskjoldbruskkirtel, thymusvæv, (trakea), lunger, hjerte, aorta, spytkirtler, lever, milt, nyrer, binyrer, bugspytkirtel, kønskirtler, uterus, (assessoriske kønskirtler), (hud), galdeblære, spiserør, mavesæk, duodenum, jejunum, ileum, coecum, tyktarm, endetarm, urinblære, en repræsentativ lymfeknude, (kvindelig brystkirtel), (lårmuskulatur), perifer nerve, (øjne), sternum med knoglemarv, (femur inklusive ledflade) og (rygmarv i tre forskellige snit — cervikalt, midt for thorax og lumbalt).

(Væv, der er nævnt i parentes, behøver kun undersøges, hvis der er tale om toksicitetstegn eller kan sættes i forbindelse med målorganer.)

Histopatologiske undersøgelser

Der skal foretages en fuld histopatologisk undersøgelse af væv og organer fra dyr i kontrolgruppen samt i den gruppe, der har fået indgivet den højeste dosis. Yderligere histopatologiske undersøgelser af dyr fra de øvrige grupper bør foretages på organer, som i den gruppe, der har fået indgivet den højeste dosis, har vist tegn på læsioner, eller som på grundlag af de kliniske observationer indicerer, at der er behov for en sådan undersøgelse.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, antal dyr med læsioner og for hver type af læsioner den procentdel dyr, der udviser den pågældende læsion. Evaluering af resultaterne skal baseres på en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapporten

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- dyreart, stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.
- forsøgsbetingelser
- dosisniveauer (med angivelse af vehikel, hvor et sådant er anvendt) samt koncentrationer
- oplysninger om toksisk reaktion inddelt efter køn og dosis
- ikke toksisk dosis, hvis en sådan er konstateret
- død tidspunkt under forsøget eller overlevelse af forsøgsdyr til forsøgets slutning
- toksiske eller andre virkninger (især kliniske fund)
- observationstidspunkt for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten
- dato for foder og vægt
- oftalmologiske fund

-
- hæmatologiske undersøgelser og samtlige resultater (herunder resultater af urinalyse)
 - klinisk-biokemiske analyser og samtlige resultater
 - obduktionsfund
 - detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund
 - eventuel statistisk behandling af resultaterne
 - diskussion af resultaterne
 - fortolkning af resultaterne.

3.2. **Vurdering og fortolkning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. **LITTERATURHENVISNINGER**

Se den generelle indledning til afsnit B.

SUBKRONISK TOKSICITET, OPTAGELSE GENNEM HUDEN**90 DAGES GENTAGEN DOSERING PÅ HUD UNDER ANVENDELSE AF GNAVERE****1. METODE****1.1. Indledning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Teststoffet påføres dagligt huden på grupper af forsøgsdyr, idet der gives en bestemt gradueret dosis til hver gruppe gennem en periode på 90 dage. Dyrene observeres dagligt i forsøgsperioden. Eventuelle tegn på toksicitet registreres. De dyr, der dør under forsøget eller aflives ved afslutningen af forsøget, obduceres.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden*Forberedelser*

Dyrene holdes under forsøgsbetingelserne med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage inden forsøget påbegyndes. Unge, sunde, dyr fordeles randomiseret i grupper. Kort før forsøget indledes, klippes pelsen på ryggen på forsøgsdyrene. Såfremt pelsen barberes bort, bør det ske ca. 24 timer, inden forsøget indledes. Klippingen eller barberingen må som regel gentages med en uges mellemrum. Man må ved klipping eller barbering passe på ikke at beskadige huden. Mindst 10 % af dyrets overflade skal kunne anvendes til påføring af teststoffet. Ved afgørelse af, hvilket og hvor stort et område, der skal klippes, bør der tages hensyn til dyrets vægt. Ved testning af faste stoffer, som — hvis det er hensigtsmæssigt — kan pulveriseres, skal teststoffet fugtes tilstrækkeligt med vand eller om nødvendigt med et passende vehikel for at sikre god kontakt med huden. Flydende teststoffer påføres normalt ufortyndet. Der skal anvendes daglig applikation fem til syv dage ugentligt.

*Forsøgsbetingelser***Forsøgsdyr**

Der kan anvendes voksne rotter eller kaniner. Der kan anvendes andre dyrearter, men i så fald skal dette være begrundet. Der benyttes dyr af almindeligt anvendte stammer. For begge køn af forsøgsdyr gælder det, at variationen i deres vægt ikke må overskride $\pm 20\%$ af en rimelig gennemsnitsvægt. Hvis en undersøgelse af subkronisk toksicitet udføres som et forstudium til en langtidsundersøgelse, bør samme dyreart og stamme anvendes i begge undersøgelser.

Antal og køn

Der anvendes mindst 20 dyr (ti hunner og ti hanner) med sund hud til hvert dosisniveau. Hunnerne må ikke have født og må ikke være drægtige. Det kan i nogle tilfælde begrundes at vælge et mindre antal forsøgsdyr, navnlig når der er tale om kaniner.

Dosisniveauer

Til forsøget anvendes et tilstrækkeligt antal dosisniveauer, mindst tre. Hvis et vehikel anvendes, anvendes ud over en kontrolgruppe en vehikelkontrolgruppe.

Applikationsperioden skal være mindst seks timer dagligt, samme periode hver dag.

Vehikelkontrolgruppen doseres på samme måde som forsøgsgrupperne og påføres samme mængde vehikel som den gruppe, der modtager den højeste dosis. Den højeste dosis bør have toksisk effekt men ikke forårsage dødsfald eller kun meget begrænset dødelighed. Den laveste dosis bør ikke have nogen toksisk effekt overhovedet. Hvis der foreligger en anvendelig vurdering af menneskers eksponering for stoffet, bør den laveste dosis ikke overskride denne eksponering.

Ideelt set bør middeldosis frembringe de mindste observerbare toksiske effekter. Hvis der anvendes mere end en middeldosis, bør de gradueres med henblik på at opnå en graduering af den toksiske virkning. I den lavt doserede og middeldoserede gruppe og i kontrolgrupperne bør dødeligheden holdes på et lavt niveau for at give mulighed for en meningsfuld vurdering af resultaterne.

Hvis teststoffet forårsager alvorlig hudirritation, bør koncentrationen sænkes, og der kan derved ske en reduktion eller et fuldstændigt bortfald af de øvrige toksiske effekter på den højeste dosis. Hvis huden er blevet alvorligt beskadiget, kan det være nødvendigt at afbryde forsøget og foretage et nyt forsøg med en lavere koncentration.

Grænsetest

Hvis et dosisniveau på 1 000 mg/kg legemsvægt eller et højere dosisniveau fastsat ud fra kendskabet til den eventuelle eksponering, mennesker udsættes for, ikke giver nogen toksisk virkning, kan yderligere forsøg betragtes som unødvendige.

Observationsperiode

Dyrene observeres dagligt, og det registreres, om der optræder tegn på toksicitet. Dødstidspunkt og tidspunkt for toksicitetstegns optræden og forsvinden skal registreres.

Fremgangsmåde

Dyrene skal holdes i hvert sit bur. Den ideelle dosering er påføring af teststoffet syv dage om ugen i en periode på 90 dage.

Eventuelle satellitgrupper beregnet til efterfølgende observationer bør holdes under observation i yderligere 28 dage, efter at påføringen af teststoffet er afsluttet, således at man har mulighed for at registrere, om toksiske virkninger er reversible eller om de persisterer. Ekspositionsperioden skal være seks timer dagligt.

Teststoffet påføres jævnt over et område, som svarer til ca. 10% af den samlede kropsoverflade. Med stærkt toksiske stoffer kan der anvendes et mindre område, men stoffet bør påføres så tyndt og ensartet og over så stor en del af området som muligt.

Teststoffet holdes i kontakt med huden ved hjælp af en porøs gazeforbinding og en ikke-hudirriterende klæbestrimmel. Teststedet skal desuden dækkes på en sådan måde, at gazeforbindingen og teststoffet holdes sikkert fast, så det sikres, at dyrene ikke indtager teststoffet. Der kan anvendes andre foranstaltninger, som forhindrer dyrene i at indtage teststoffet, men man bør ikke immobilisere dem fuldstændigt.

Ved eksponeringsperiodens slutning fjernes eventuelt tilbagesiddende teststof, idet der anvendes vand eller en anden egnet metode til at rense huden.

Alle dyr observeres dagligt, og det registreres, om der optræder tegn på toksicitet, hvornår disse tegn optræder første gang, hvor længe de varer, og hvor kraftige de er. Inspektion af dyrene skal omfatte forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønstret. Der holdes ugentligt regnskab med foderindtagelsen, og dyrene vejes en gang om ugen. Dyrene observeres med jævne mellemrum med henblik på, at det mindst mulige antal dyr går tabt for undersøgelsen på grund af f.eks. kannibalisme, autolyse af væv eller forveksling. Ved forsøgets afslutning aflives og obduceres alle tilbageværende dyr med undtagelse af satellitgrupperne. Døende dyr skal fjernes og obduceres, så snart de registreres.

Alle dyr inklusive kontrolgruppen underkastes normalt følgende undersøgelser:

- a) Ophthalmologisk undersøgelse med anvendelse af et oftalmoskop eller lignende passende udstyr skal foretages inden påføring af teststoffet og ved undersøgelsens afslutning. Det må foretrækkes, at alle dyr undersøges, men sker dette ikke, undersøges mindst den gruppe, der påføres den højeste dosis og kontrolgruppen. Hvis der observeres forandringer i øjnene, skal alle dyrene undersøges.

- b) Hæmatologiske undersøgelser omfattende hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, erytrocyttælling, total og differential leukocyttælling, måling af koaguleringssevne f.eks. koagulationstid, protrombintid, tromboplastintid eller blodpladetælling skal foretages ved forsøgets afslutning.
- c) Klinisk biokemisk analyse af blod skal foretages ved afslutningen af forsøget. Relevante analyseområder for alle forsøg er elektrolytbalance, kulhydratstofskefte, lever- og nyrefunktion. Valg af specifikke tests afhænger af observationer af teststoffets virkning. Følgende bestemmelser kan foreslås: calcium, fosfor, klorid, natrium, kalium, fasteglukose (fasteperioden vil afhænge af dyrearten), serum alanin aminotransferase (ALAT), serum aspartat aminotransferase (ASAT), ornitin decarboxylase, gamma glutamyl transpeptidase, urinstof, albumin, kreatinin, total bilirubin og total serumprotein. Andre bestemmelser, der kan være påkrævede i en adækvat toksikologisk vurdering, omfatter lipidanalyser, hormonanalyser, syre/basebalance, methæmoglobin, cholinesteraseaktivitet. Der kan anvendes yderligere klinisk-biokemisk analyse, hvor det skønnes nødvendigt for en videre undersøgelse af de observerede virkninger.
- d) Rutinemæssig urinanalyse er ikke påkrævet, medmindre den indiceres af forventede eller observerede toksiske virkninger.

Hvis historiske basaldata er inadækvate, skal man gøre sig overvejelser over anvendelsen af hæmatologiske og klinisk biokemiske parametre, inden forsøget begynder.

Makroskopisk undersøgelse

Alle forsøgsdyrene skal underkastes en fuldstændig makroskopisk vurdering, der omfatter undersøgelse af kropsoverflade, alle kropsåbninger og kranie-, thorax- og abdominalhulerne og deres indhold. Lever, nyrer, binyrer og testikler vejes så hurtigt som muligt efter dissektion for at undgå udtørring. Følgende væv og organer skal opbevares i et passende medium med henblik på mulig senere histopatologisk undersøgelse: alle væv og organer, som udviser læsioner, hjerne, herunder snit af medulla/pons, den cerebellare og cerebrale cortex, hypofyse, skjoldbrusk/biskjoldbruskkirtel, thymusvæv, (trakea), lunger, hjerte, aorta, spytkirtler, lever, milt, nyrer, binyrer, bugspytkirtel, kønskirtler, uterus, assesoriske kønskirtler, galdeblære (hvis den findes), spiserør, mavesæk, duodenum, jejunum, ileum, coecum, tyktarm, endetarm, urinblære, en repræsentativ lymfeknude, (kvindelig brystkirtel), (lår Muskulatur), perifer nerve, (øjne), (sternum med benmarv), (femur inklusive ledflade), (rygmarv i tre forskellige snit — cervikalt, midt for thorax og lumbalt) og (exorbitale tårkirtler).

(Væv, der er nævnt i parentes, behøver kun undersøges, hvis der er tale om toksicitetstegn eller kan sættes i forbindelse med målorganer.)

Histopatologiske undersøgelser

- a) Der skal foretages en fuldstændig histopatologisk undersøgelse af organer og væv fra dyrene i kontrolgruppen og i den gruppe, der har fået påført den højeste dosis.
- b) Alle alvorlige læsioner skal undersøges.
- c) Målorganer skal også undersøges i øvrige doserede grupper.
- d) Når der anvendes rotter, undersøges lungerne fra dyrene i den lavest doserede og de middeldoserede grupper histopatologisk med henblik på konstatering af tegn på infektion, idet dette giver en egnet vurdering af dyrenes helbredstilstand. Der er ikke rutinemæssigt behov for yderligere histopatologiske undersøgelser af dyrene i disse grupper, men organer, som viser tegn på læsioner i den gruppe, der har fået påført den højeste dosis, skal altid undersøges.
- e) Dyrene i en eventuel satellitgruppe skal underkastes en histopatologisk undersøgelse af de væv og organer, der udviser toksisk påvirkning i de øvrige grupper.

2.

DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, antal dyr med læsioner og for hver type af læsioner den procentdel dyr, der udviser den pågældende læsion. Evaluering af resultaterne skal baseres på en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. RAPPORTERING**3.1. Forsøgsrapport**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- dyreart, stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.
- forsøgsbetingelser
- dosisniveauer (med angivelse af vehikel, hvor et sådant er anvendt) samt koncentration
- ikke toksisk dosis, hvis en sådan er konstateret
- oplysninger om toksisk reaktion inddelt efter køn og dosis
- dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse af forsøgsdyr til forsøgets slutning
- toksiske eller andre virkninger
- observationstidspunkt for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten
- data for foder og vægt
- oftalmologiske fund
- hæmatologiske undersøgelser og samtlige resultater
- klinisk biokemiske analyser og samtlige resultater (herunder resultater af urinalyse)
- obduktionsfund
- detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund
- eventuel statistisk behandling af resultaterne
- diskussion af resultaterne
- fortolkning af resultaterne.

3.2. Vurdering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B.

SUBKRONISK TOKSICITET, INHALATION

90 DAGES GENTAGEN INHALATION UNDER ANVENDELSE AF GNAVERE

1. METODE**1.1. Indledning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Flere grupper af forsøgsdyr eksponeres dagligt i en fastlagt periode for teststoffet, idet hver gruppe eksponeres for en bestemt koncentration i en periode på 90 dage. Anvendes der et vehikel til at frembringe en passende koncentration af teststoffet, bør der i forsøget indgå en kontrolgruppe, der udsættes for vehiklet alene. Dyrene observeres dagligt for toksicitetstegn. Dyr, der dør under forsøget, eller som aflives ved forsøgets slutning, obduceres.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden*Forberedelser*

Dyrene holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, før forsøget påbegyndes. Unge, sunde, dyr fordeles randomiseret i det nødvendige antal grupper. Der kan anvendes et vehikel til at frembringe en passende koncentration af teststoffet i luften. Hvis der anvendes et vehikel eller andre tilsætningsstoffer med henblik på at lette doseringen, skal det være påvist, at de ikke har nogen toksisk virkning. Her kan tidligere opsamlede data benyttes.

*Forsøgsbetingelser***Forsøgsdyr**

Rotter er den foretrukne dyreart, medmindre der foreligger kontraindikationer. Der benyttes unge, sunde rotter af almindeligt anvendte laboratoriestammer. Ved forsøgets begyndelse må vægten af de anvendte dyr ikke variere mere end $\pm 20\%$ af gennemsnitsvægten. Hvis en undersøgelse af subkronisk toksicitet ved inhalation udføres som et forstudium til en langtidsundersøgelse, bør samme dyreart og stamme anvendes i begge undersøgelser.

Antal og køn

Der anvendes mindst 20 dyr (ti hun- og ti handyr) til hver dosisniveau. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. Hvis der påregnes aflivning af dyr under forsøget, bør det oprindelige antal dyr forøges med det antal dyr, man påregner at aflive i løbet af forsøget. Man kan samtidig eksponere en satellitgruppe på 20 dyr (ti af hvert køn) for det højeste koncentrationsniveau gennem 90 dage og observere, hvorvidt virkninger i en periode på 28 dage efter forsøget er reversible, persisterende eller optræder forsinket.

Ekspositionskoncentrationer

Der skal anvendes mindst tre forskellige koncentrationsniveauer samt en kontrolgruppe eller en vehikel kontrolgruppe (svarende til den højeste koncentration af vehikel), såfremt der benyttes et vehikel. Dyrene i kontrolgruppen behandles nøjagtigt som dyrene i forsøgsgrupperne bortset fra eksponering for teststoffet. Den højeste koncentration bør have toksisk effekt, men ikke forårsage dødelighed eller kun en meget begrænset dødelighed. Hvis der foreligger en anvendelig vurdering af menneskers eksponering for stoffet, bør den laveste koncentration overskride denne eksponering. Ideelt set bør middelkoncentrationen frembringe de mindste observerbare toksiske effekter. Hvis der anvendes mere end en middelkoncentration, bør de vælges således, at der opnås en graduering af den toksiske virkning.

I den lavt doserede og middeldoserede gruppe og i kontrolgruppen bør dødeligheden holdes på et lavt niveau for at give mulighed for en meningsfuld vurdering af resultaterne.

Eksponeringsstid

Den daglige eksponeringsperiode er seks timer, efter at koncentrationerne i kamrene er ækvilibreret. Andre perioder kan anvendes, hvis undersøgelsen skal imødekomme særlige krav.

Udstyr

Dyrene skal testes med inhalationsapparat, der er således udformet, at der kan opretholdes en dynamisk luftgennemstrømning på mindst 12 luftskift pr. time, samtidig med at der sikres et adækvat iltindhold og en jævnt fordelt ekspositionsluft. Benyttes der et kammer, bør det være således indrettet, at der undgås sammenklumpning af forsøgsdyrene og sikres en så stor inhalation af teststoffet som muligt. Den generelle regel er, at hvis der skal sikres en stabil atmosfære, må dyrenes totale »volumen« ikke overstige 5 % af ekspositionskammerets volumen. Eksposition kan foregå gennem mund-næse, hovedet alene eller ved kamre til hele kroppen. Ved anvendelse af de to første muligheder opnår man, at indtagelse af teststoffet ad andre veje reduceres.

Observationsperiode

Alle dyr observeres dagligt for tegn på toksicitet under hele forsøget og under restitutionperioden. Dødstidspunkt og toksicitetstegns optræden og forsvinden registreres.

Fremgangsmåde

Dyrene eksponeres for teststoffet dagligt i fem til syv dage om ugen i en periode på 90 dage. Eventuelle satellitgrupper beregnet til længerevarende observationer skal holdes under observation i yderligere 28 dage, efter at eksponering for teststoffet er afsluttet, således at man har mulighed for at registrere, om en toksisk virkning er reversibel eller persisterer. Temperaturen under forsøget bør holdes på $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}$. Under ideelle forhold skal den relative luftfugtighed holdes på mellem 30 % og 70 %, men i visse tilfælde (f.eks. ved testning af aerosoler) kan dette være praktisk uigennemførligt. Der gives hverken foder eller vand under ekspositionen.

Der anvendes et dynamisk inhalationssystem med et passende analytisk kontrolsystem til sikring af ekspositions-koncentration. Det anbefales at foretage en prøvetest for at finde frem til passende ekspositions-koncentrationer. Lufthastigheden tilpasses, således at der er ensartede forhold i hele ekspositionskammeret. Systemet bør være af en sådan beskaffenhed, at der så hurtigt som muligt opnås stabile ekspositions-betingelser.

Der skal foretages måling og kontrol af:

- a) Lufthastighed (kontinuerlig).
- b) Den faktiske koncentration af teststoffet målt i vejtrækningszonen. Koncentrationen må under den daglige eksponeringsperiode ikke variere mere end $\pm 15\%$ fra gennemsnitskoncentrationen. Det kan imidlertid være umuligt at opnå en sådan grad af kontrol med støvpartikler og aerosoler, og i så tilfælde kan større udsving accepteres. Koncentrationerne bør fra dag til dag holdes så konstante som muligt under hele forsøgets forløb. Under indkøring af udstyret bør der foretages analyser af partikelstørrelse for at fastslå aerosolkoncentrationernes stabilitet. Under eksponering skal der foretages analyser så ofte, som det er nødvendigt for at fastslå, om partikelstørrelsen er jævnt fordelt.
- c) Temperatur og luftfugtighed.
- d) Under og efter eksposition foretages der systematiske observationer, som registreres for hvert enkelt dyr. Alle dyr inspiceres dagligt, og det registreres, om der optræder tegn på toksicitet, hvornår disse tegn optræder første gang, hvor længe de varer, og hvor kraftige de er. Inspektionen af dyrene skal omfatte forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønstret. Der holdes ugentligt regnskab med foderindtagelsen, og dyrene vejes en gang om ugen. Dyrene observeres med jævne mellemrum med henblik på, at det mindst mulige antal dyr går tabt for

undersøgelsen på grund af f.eks. kannibalisme, autolyse af væv eller forveksling. Ved forsøgets afslutning aflives og obduceres alle tilbageværende dyr med undtagelse af satellitgruppen. Døende dyr bør fjernes og obduceres, så snart de registreres.

Alle dyr inklusive kontrolgruppen skal normalt underkastes følgende undersøgelser:

- a) Oftalmologisk undersøgelse med anvendelse af et oftalmoskop eller lignende passende udstyr skal foretages inden eksposition for teststoffet og ved undersøgelsens afslutning. Det må foretrækkes, at alle dyr undersøges, men sker dette ikke, undersøges mindst den gruppe, der eksponeres for den højeste dosis og kontrolgruppen. Hvis der observeres forandringer i øjnene, bør alle dyrene undersøges.
- b) Hæmatologiske undersøgelser omfattende hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, erytrocyttælling, total og differential leukocyttælling, måling af koaguleringssevne f.eks. koagulationstid, protrombintid, tromboplastintid eller blodpladetælling skal foretages ved forsøgets afslutning.
- c) Klinisk-biokemisk analyse af blod skal foretages ved afslutningen af forsøget. Relevante analyseområder for alle forsøg er elektrolytbalance, kulhydratstofs-kifte, lever- og nyrefunktion. Valg af specifikke tests afhænger af observationer af teststoffets virkning. Følgende bestemmelser kan foreslås: kalcium, fosfor, klorid, natrium, kalium, fasteglukose (fasteperioden vil afhænge af dyrearten), serum alanin aminotransferase (ALAT), serum aspartat aminotransferase (ASAT), ornitin, decarboxylase, gamma glutamyl transpeptidase, urinstof, albumin, blodkreatinin, total bilirubin og total serumprotein. Andre bestemmelser, der kan være påkrævede i en adækvat toksikologisk vurdering omfatter lipidanalyser, hormonanalyser, syre/basebalance, methæmoglobin, cholinesteraseaktivitet. Der kan anvendes yderligere klinisk-biokemisk analyse, hvor det skønnes nødvendigt for en videre undersøgelse af de observerede virkninger.
- d) Rutinemæssig urinanalyse er ikke påkrævet, medmindre den indiceres af forventede eller observerede toksiske virkninger. Hvis historiske basaldata er inadækvate, bør man gøre sig overvejelser over bestemmelse af hæmatologiske og klinisk-biokemiske parametre, inden forsøget begynder.

Makroskopisk undersøgelse

Alle forsøgsdyrene skal underkastes en fuldstændig makroskopisk vurdering, der omfatter undersøgelse af kropsoverflade, alle kropsåbninger og kranie-, thorax- og abdominalhulerne og deres indhold. Lever, nyrer, binyrer og testikler vejes så hurtigt som muligt efter dissektionen for at undgå udtørring. Følgende væv og organer skal opbevares i et passende medium med henblik på mulig senere histopatologisk undersøgelse: alle væv og organer, som udviser læsioner, lunger, som bør udtages intakt, vejes og behandles med et passende fiksativ, således at lungestrukturen bevares (perfusion med fiksativet betragtes som en effektiv fremgangsmåde), væv fra næse og naso-farynx, hjerne, herunder snit af medulla/pons, den cerebellare og cerebrale cortex, hypofyse, skjoldbrusk/biskjoldbruskkirtel, thymusvæv, trakea, hjerte, aorta, spytkirtler, lever, milt, nyrer, binyrer, bugspytkirtel, kønskirtler, uterus, (assessoriske kønskirtler), (hud), galdeblære (hvis en sådan forefindes), spiserør, mavesæk, duodenum, jejunum, ileum, cœcum, tyktarm, endetarm, urinblære, en repræsentativ lymfeknude, (kvindelig brystkirtel), (lårmuskulatur), perifer nerve, (øjne), sternum med benmarv, (femur inklusive ledflade), (rygmarv i tre forskellige snit — cervikalt midt for thorax og lumbalt) og (exorbitale tårekirtler).

(Væv, der er nævnt i parentes, behøver kun undersøges, hvis der er tale om toksicitetstegn eller kan sættes i forbindelse til målorganer.)

Histopatologisk undersøgelse

- a) Der skal foretages en fuldstændig histopatologisk undersøgelse af luftvejene og andre organer og væv fra dyrene i kontrolgruppen og i den gruppe, der eksponeres for den højeste dosis.
- b) Alle alvorlige læsioner skal undersøges.
- c) Målorganer skal også undersøges i øvrige doserede grupper.
- d) Lungerne fra dyrene i den lavest doserede og de middeldoserede grupper skal underkastes histopatologisk undersøgelse, eftersom dette giver en egnet vurdering af dyrenes helbredstilstand. Der er ikke rutinemæssigt behov for yderligere histopatologiske undersøgelser af dyrene i disse grupper, men organer, som viser tegn på læsioner i den gruppe, der eksponeres for den højeste dosis, skal altid undersøges.
- e) Dyrene i en eventuel satellitgruppe skal underkastes en histopatologisk undersøgelse af de væv og organer, der udviser toksisk påvirkning i de øvrige grupper.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, antal dyr med læsioner og for hver type af læsioner den procentdel dyr, der udviser den pågældende læsion. Evaluering af resultaterne skal baseres på en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- dyreart, stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.
- forsøgsbetingelser:

Beskrivelse af ekspositionsapparat, herunder udformning, type, dimensionering, luftkilde, system til frembringelse af partikler og aerosoler, metode til konditionering af luften, behandling af udpumpet luft og den måde, hvorpå dyrene holdes i et ekspositionskammer, når et sådant benyttes. Apparatet til måling af temperatur, fugtighed og eventuelle partikulære aerosolers koncentration og partikelstørrelse beskrives.

Ekspositionsdata: Disse skal opstilles i tabelform og angive middelværdier og variation (f.eks. standardafvigelse) og bør omfatte:

- a) lufthastighed gennem inhalationsudstyret
 - b) luftens temperatur og fugtighed
 - c) nominelle koncentrationer (total mængde teststof tilført inhalationsapparatet divideret med luftmængden)
 - d) type af vehikel, hvor et sådant er anvendt
 - e) faktiske koncentrationer i opholdsarealet under forsøget
 - f) middelværdien af partikelstørrelser (hvor dette er relevant)
- oplysning om toksisk reaktion inddelt efter køn og dosis
 - ikke toksisk dosis, hvis en sådan er konstateret
 - dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse til forsøgets slutning
 - toksiske eller andre virkninger
 - observationstidspunkt for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten
 - data for foder og vægt
 - oftalmologiske fund
 - hæmatologiske undersøgelser og samtlige resultater
 - klinisk-biokemiske analyser og samtlige resultater (herunder resultater af urinanalyse)
 - obduktionsfund
 - detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund
 - eventuel statistisk behandling af resultaterne
 - diskussion af resultaterne
 - fortolkning af resultaterne.

3.2. Vurdering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B.

TERATOGENECITETSUNDERSØGELSE I GNAVERE OG IKKE-GNAVERE

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Principper for testmetoden

Flere grupper af drægtige forsøgsdyr indgives dagligt teststoffet i forskellige doser eller koncentrationer, idet der anvendes en bestemt koncentration eller dosis til hver enkelt gruppe i mindst den del af drægtighedsperioden, der dækker organogenesen. Kort før det forventede fødselstidspunkt aflives moderdyret, uterus fjernes, og indholdet undersøges. Denne metode dækker embryo- og føtotoksicitet.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Unge, sunde udvoksede hundyr, som ikke har været parret, og som er af ca. samme alder og størrelse, akklimatiseres laboratoriebetingelserne i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Dyrene parres med handyr, hvis frugtbarhed på forhånd er vurderet, og fordeles randomiseret i grupper. Parringen kan foregå naturligt eller ved kunstig inseminering.

Hunddyrene indgives dagligt teststoffet straks efter implantationen og videre gennem hele organogenesen. En dag før det forventede fødetidspunkt udtages fostrene ved hysterektomi, og de undersøges for abnormiteter i organer eller skelet, herunder ratarderet vækst, forsinket ossificering og intestinale hæmorrhagier.

*Forsøgsbetingelser**Forsøgsdyr*

De almindeligst anvendte forsøgsdyr er rotter, mus, hamstre og kaniner. De foretrukne arter er rotten og kaninen. Der benyttes almindeligst anvendte laboratoriestammer. Stammen bør ikke have en lav fertilitet, og den bør være kendt for at reagere på teratogener. Dyrene holdes i hvert sit bur.

Antal og køn

Der anvendes mindst 20 drægtige rotter, mus eller hamstre eller tolv drægtige kaniner til hver dosisniveau. Formålet er at sikre, at der kommer tilstrækkelig mange kuld og unger, til af teststoffets teratogene potentiale kan vurderes.

Dosisniveauer

Der skal anvendes mindst tre forskellige dosisniveauer samt en kontrolgruppe. Hvis der anvendes et vehikel, bør der også være en vehikelkontrolgruppe. Et eventuelt vehikels toksikologiske egenskaber bør være kendt, og det må ikke være teratogent eller påvirke reproduktionen. Dyrene i kontrolgruppen behandles nøjagtigt som dyrene i forsøgsgrupperne bortset fra indgivelse af teststoffet. Medmindre der er begrænsninger som følge af teststoffets

fysisk-kemiske natur eller biologiske egenskaber, bør den højeste dosis forårsage en vis umiddelbar konstaterbar toksicitet hos moderdyret såsom let vægttab, men ikke mere end 10 % dødsfald blandt moderdyrene. Den laveste dosis bør ikke have nogen toksisk effekt. Middeldosis (evt. flere) gradueres geometrisk mellem den største og den mindste dosis.

Grænsetest

Hvis der ikke konstateres embryonal toksicitet eller teratogenicitet ved en dosis på 1 000 mg/kg af et stof med lav toksicitet, kan yderligere testning betragtes som unødvendig.

Eksponeringsstid

Forsøgets dag 0 er den dag, hvor man (for så vidt det er muligt) observerer en vaginalprop og/eller sperma. Eksponeringsperioden bør dække den centrale organogenese. Det vil sige omkring dag 6 til 15 for rotter og mus, dag 6 til 14 for hamstre og dag 6 til 18 for kaniner. Hvis dag 0 fastlægges på grundlag af parringen eller kunstig inseminering, bør de oplyste perioder justeres ved addering af en dag. Alternativt kan doseringsperioden udstrækkes til ca. en dag før det forventede fødetidspunkt.

Observationsperiode

Der skal foretages en grundig klinisk undersøgelse mindst en gang om dagen. Herudover bør dyrene med jævne mellemrum observeres med henblik på, at færrest mulige dyr tabes for undersøgelsen.

Fremgangsmåde

Teststoffet indgives oralt med mavesonde.

Stoffet skal indgives på ca. samme tidspunkt hver dag.

Forsøgsdyrene behandles med teststoffet hver dag i den fastlagte doseringsperiode. Dosis kan baseres på vægten af hunddyrene ved doseringsperiodens begyndelse, eller man kan under hensyntagen til den hurtige vægtforøgelse i drægtighedsperioden veje dyrene regelmæssigt og basere dosis på den senest registrerede vægt. Det registreres, hvornår toksicitetstegn optræder første gang, hvor længe de varer, og hvor kraftige de er. Dyr, der viser symptomer på abort eller for tidlig fødsel, aflives og underkastes en grundig makroskopisk vurdering. Observationen fortsættes efter doseringsperioden indtil ca. en dag før det beregnede fødselstidspunkt. Formålet er at dække det meste af drægtighedsperioden, men at undgå de fortolkningsmæssige komplikationer, der kan forekomme i forbindelse med en naturlig fødsel. Observationerne skal omfatte men ikke nødvendigvis begrænses til forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønstret. Der holdes ugentligt regnskab med foderindtagelse. Dyrene vejes en gang om ugen.

Makroskopisk undersøgelse

Moderdyr, som dør under forsøget, og dyr, der aflives efter forsøget, underkastes en makroskopisk vurdering med registrering af alle strukturelle abnormiteter eller patologiske ændringer, der kan have haft indflydelse på drægtigheden. Straks efter at dyret er dødt, fjernes uterus, og indholdet undersøges med henblik på konstatering af eventuelle døde fostre på det embryonale stade eller senere stadier og antallet af levende fostre. Hvis der er tale om dødsfald in utero, er det normalt muligt at vurdere dødstidspunktet. Hos rotter og kaniner kan antallet af corpora lutea fastlægges. Fostrenes køn bestemmes, og de vejes individuelt, vægten noteres, og fostrenes middelvægt beregnes. Efter udtagning undersøges hvert enkelt foster eksternt. Hos rotter, mus og hamstre præpareres mellem en tredjedel og halvdelen af hvert kuld, og præparaterne undersøges for skeletabnormiteter, mens den tiloversblevne del af hvert kuld præpareres og undersøges for bløddelsabnormiteter under anvendelse af egnede metoder. Kaninfostre undersøges individuelt ved omhyggelig dissektion med henblik på konstatering af organabnormiteter, og undersøges derefter for skeletabnormiteter.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, antal dyr, som blev drægtige, absolut og procentvist antal levende fostre og fostre med bløddels- eller skeletabnormiteter og deres tilhørsforhold til det enkelte kuld. Evaluering af resultaterne skal baseres på en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- dyreart, stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.
- forsøgsbetingelser
- dosisniveauer (med angivelse af vehikel, hvor et sådant er anvendt) samt koncentrationer
- oplysning om toksisk reaktion inddelt efter dosis
- ikke toksisk dosis, hvis en sådan er konstateret
- dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse af forsøgsdyr til forsøgets slutning
- toksiske eller andre virkninger
- observationstidspunkt for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten
- data for foder og vægt
- drægtighedens varighed og oplysninger om de enkelte kuld (inklusive historiske data)
- oplysninger om fostrene (levende/dødt, køn, bløddels- og skeletdefekter)
- oplysninger om de enkelte kuld (levende/dødt, køn, bløddels- og skeletdefekter for hvert enkelt kuld)
- statistisk behandling af resultaterne
- diskussion af resultaterne
- fortolkning af resultaterne.

3.2. Vudering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B.

UNDERSØGELSE AF KRONISK TOKSICITET

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Flere grupper af forsøgsdyr doseres normalt syv dage om ugen med teststof på passende måde. Der gives en dosis pr. gruppe i størstedelen af dyrenes levetid. Under og efter dosering med teststoffet observeres dyrene dagligt, og eventuelle tegn på toksicitet registreres.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Dyrene holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Unge, sunde, dyr fordeles randomiseret i test- og kontrolgrupper.

*Forsøgsbetingelser**Forsøgsdyr*

Rotten er det foretrukne forsøgsdyr. Andre dyrearter (gnavere eller ikke-gnavere) kan anvendes, hvis tidligere gennemførte undersøgelser giver grundlag herfor. Der bør benyttes unge, sunde dyr af almindeligt anvendte laboratoriestammer, og doseringen bør indledes så hurtigt som muligt, efter at dyrene er vænnet fra.

Ved forsøgets begyndelse må vægten af de anvendte dyr ikke variere mere end $\pm 20\%$ af gennemsnitsvægten. Hvis en undersøgelse af subkronisk toksicitet ved oral indgift udføres som et forstudium til en langtidsundersøgelse, bør samme dyreart og stamme anvendes i begge undersøgelser.

Antal og køn

Hvis forsøgsdyrene er gnavere, anvendes mindst 40 dyr (20 hun- og 20 handyr) på hvert dosisniveau samt en kontrolgruppe. Hunddyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. 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.

Ved benyttelse af andre dyr end gnavere kan der anvendes et mindre antal, dog mindst fire af hvert køn pr. gruppe.

Dosisniveauer

Der anvendes mindst tre forskellige dosisniveauer ud over kontrolgruppen. Det højeste dosisniveau bør have tydelig toksisk effekt uden dog at forårsage voldsom dødelighed.

Det laveste dosisniveau bør ikke have nogen toksisk effekt overhovedet.

Middeldosis (evt. flere) bør ligge midtvejs mellem det højeste og det laveste dosisniveau.

Ved valget af dosisniveauer bør der tages hensyn til data fra tidligere toksicitetsundersøgelser.

Dyrene doseres normalt med teststoffet hver dag. Hvis stoffet administreres via drikkevandet eller med foderet, skal det være kontinuert tilgængeligt.

Kontrolgruppe

Der skal anvendes en kontrolgruppe, som på alle måder er identisk med forsøgsgrupperne bortset fra dosering med teststof.

Under særlige omstændigheder som f.eks. i inhalationsundersøgelser, hvor der benyttes aerosoler, eller hvis der benyttes en emulgator med ukendt biologisk virkning i undersøgelser med oral indgift, anvendes også en negativ kontrolgruppe. Den negative kontrolgruppe behandles som dyrene i forsøgsgrupperne, bortset fra at den ikke eksponeres hverken for teststoffet eller vehiklet.

Administrationsmåde

De to hovedformer for administration af teststof er oral indgift og inhalation. Valget af administrationsform afhænger af teststoffets fysiske og kemiske karakteristika og den sandsynlige måde, hvorpå mennesker eksponeres for stoffet.

Der er betydelige praktiske problemer forbundet med at påføre teststoffet på huden. Hvis kronisk systemisk toksicitet er et resultat af perkutan absorption, kan dette normalt udledes af resultaterne af tests med oral indgivelse, kombineret med et kendskab til graden af perkutan absorption på grundlag af tidligere perkutane toksicitetstests.

Oral indgift

Hvis teststoffet absorberes i mave-tarmkanalen, og hvis mennesker kan udsættes for indtagelse gennem munden, anvendes oral indgift, medmindre der foreligger kontraindikationer. Dyrene indgives teststoffet med foderet, opløst i drikkevandet eller i kapsler. Den ideelle dosering er, at dyrene får indgivet teststoffet syv dage om ugen. Hvis indgift indskrænkes til fem dage om ugen, kan der ske tilbagevenden til normal, eller der kan optræde abstinenssymptomer imellem eksponeringsperioderne, hvilket kan indvirke på resultaterne og den senere vurdering. Med udgangspunkt i praktiske overvejelser kan det accepteres, at dyrene indgives teststoffet fem dage om ugen.

Inhalation

Inhalationsundersøgelser giver mere komplekse tekniske problemer end andre former for administration af teststof. I det følgende gives derfor en mere detaljeret vejledning i gennemførelse af disse undersøgelser. Man bør også være opmærksom på, at intratrakeal instillation under særlige omstændigheder kan være et egnet alternativ.

Forsøg med langtidseksposition udformes normalt på grundlag af erfaringer fra arbejdspladser, således at dyrene eksponeres fem dage om ugen seks timer dagligt, efter at koncentrationen i kammeret er ækvilibreret (intermitterende eksposition), eller der benyttes eksponering på grundlag af erfaringer fra miljøet, dvs. syv dage om ugen og 22 til 24 timer pr. dag (kontinuert eksposition) med ca. en time om dagen på et bestemt klokkeslet til fodring af dyrene og rengøring af kammeret. I begge tilfælde eksponeres dyrene normalt for fastlagte koncentrationer af teststof. En vigtig forskel mellem intermitterende og kontinuert eksponering, som man må være opmærksom på, er, at der ved den førstnævnte metode er en periode på 17 til 18 timer, hvor dyrene kan overvinde virkningerne af den daglige eksposition og en endnu længere periode i weekenderne.

Valget mellem intermitterende og kontinuert eksponering afhænger af undersøgelsens formål og den menneskelige eksponering, der simuleres. Der er imidlertid en række tekniske vanskeligheder at tage i betragtning. F.eks. kan fordelene ved kontinuert eksponering, når det drejer sig om at simulere miljøbetingelser, falde væk på grund af behovet for vanding og fodring i ekspositionsperioden og behovet for mere komplicerede (og pålidelige) teknikker til generering og kontrol af aerosoler og dampe.

Ekspositionskamre

Dyrene testes i ekspositionskamre, der er således udformet, at der kan opretholdes en dynamisk luftstrøm på mindst tolv luftskift pr. time, samtidig med at der sikres et adækvat iltindhold og en jævnt fordelt ekspositionsluft. Kontrolkamre og ekspositionskamre bør være identiske med hensyn til konstruktion og udformning, så det sikres, at ekspositionsbetingelserne er sammenlignelige på alle måder bortset fra eksponering fra teststoffet. Der holdes normalt et let undertryk i kammeret for at forhindre, at teststoffet lækker ud i det omgivende rum. Kammeret indrettes således, at der undgås trængsel mellem forsøgsdyrene. Den generelle regel er, at hvis der skal sikres en stabil rumatmosfære, må dyrenes totale volumen ikke overstige 5% af ekspositionskammerets volumen.

Der skal foretages måling og kontrol af:

- I. Luftgennemstrømning: det må foretrækkes, at luftstrømmen gennem kammeret kontrolleres konstant.
- II. Koncentrationen må i den daglige eksponeringsperiode ikke variere mere end $\pm 15\%$ af den gennemsnitlige værdi. Under hele forsøget bør koncentrationen fra dag til dag holdes så konstant som praktisk muligt.
- III. Temperatur og fugtighed: ved anvendelse af gnavere holdes temperaturen på $22 (\pm 2^\circ \text{C})$ og fugtigheden i kammeret mellem 30 og 70 %, undtagen når der anvendes vand til suspension af teststoffet i kammerets atmosfære. Det må foretrækkes, at både temperatur og fugtighed kontrolleres konstant.
- IV. Måling af partikelstørrelse: hvis der anvendes atmosfærer med flydende eller faste aerosoler i kammeret, bør der foretages en beregning af partikelstørrelsens distribution. Aerosolpartiklerne skal være respirable for de anvendte forsøgsdyr. Der tages prøver af kammerets atmosfære i dyrenes vejtrækningszone. Luftprøverne skal være repræsentative for den partikeldistribution, dyrene eksponeres for, og det skal gennem gravimetrisk analyse være muligt på grundlag af disse luftprøver at beskrive hele aerosolen, også selv om meget af den ikke er respirabel. Under indkøring af udstyret bør der foretages hyppige analyser af partikelstørrelsen for at sikre aerosolkoncentrationernes stabilitet. Under eksponering foretages analyser så ofte, som det er nødvendigt for en adækvat bestemmelse af, om den partikeldistribution, dyrene eksponeres for, er konstant.

Undersøgelsens varighed

Ekspositionen bør vare i mindst tolv måneder.

Fremgangsmåde

Observation

Der foretages en grundig klinisk undersøgelse mindst en gang om dagen. Herudover bør dyrene med jævne mellemrum inspiceres for at det mindst mulige antal dyr går tabt for undersøgelsen. Det vil sige, døde dyr obduceres eller nedfryses, og svage eller døende dyr isoleres eller aflives. Der foretages omhyggelig registrering af alle tegn på toksicitet, hvornår disse tegn optræder første gang, og hvor længe de varer, og det sikres, at det mindst mulige antal dyr går tabt for undersøgelsen på grund af sygdomme, autolyse af væv eller kannibalisme.

Hos alle dyr foretages registrering af kliniske symptomer, herunder neurologiske forandringer, forandringer i øjne og mortalitet. Toksicitetstegnens optræden og udvikling og mistanke om forekomst af tumorer skal registreres.

Dyrene vejes enkeltvis en gang om ugen i de første 13 uger af forsøgsperioden og mindst en gang hver fjerde uge derefter. Foderindtagelse bestemmes en gang om ugen i de første 13 uger og derefter ca. hver tredje måned, medmindre andet indiceres af helbredstilstanden eller ændringer i legemsvægten.

Hæmatologisk undersøgelse

Hæmatologisk undersøgelse (f.eks. hæmoglobinkoncentration, hæmatokrit, erytrocyttælling, total leukocytælling, blodpladerælling og målinger af koaguleringssevnen) udføres efter tre måneder, seks måneder og derefter ca. hver sjette måned samt ved forsøgets afslutning på blodprøver, som ved andre dyr end gnavere tages på hvert enkelt dyr og på rotter på ti dyr pr. køn i alle grupper. Hvis det er muligt, bør prøverne tages fra de samme rotter hver gang. Fra andre dyr end gnavere bør der tages en prøve, inden forsøget påbegyndes.

Hvis kliniske observationer tyder på, at dyrenes helbredstilstand er blevet dårligere under forsøget, foretages en differential tælling på prøver fra de pågældende dyr.

Der foretages en differential tælling på prøver fra dyr i den gruppe, som har været eksponeret for den højeste dosis og fra dyr i kontrolgruppen. Der udføres kun differential tælling på prøver fra dyr i den gruppe, der har fået den næsthøjeste dosis, hvis der er stor forskel på den højest doserede gruppe og kontrolgruppen, eller hvis den patologiske undersøgelse indikerer det.

Urinanalyse

Der indsamles urinprøver til analyse fra alle andre dyr end gnavere og fra ti rotter pr. køn i alle grupper om muligt fra de samme rotter hver gang med samme intervaller som de ovenfor nævnte blodprøver. Følgende undersøgelser gennemføres på prøver enten fra enkelte dyr eller for rotters vedkommende på en samlet urinprøve/køn/gruppe:

— udseende: rumfang og vægtfylde for hvert enkelt dyr

- protein, glukose, ketonstof, hæmaturi (semikvantitativt), og
- sedimentmikroskopi (semikvantitativt).

Klinisk-kemisk undersøgelse

Der udtages blodprøver til klinisk-kemisk undersøgelse med ca. seks måneders mellemrum under forsøget og ved forsøgets afslutning fra hvert enkelt dyr, såfremt det drejer sig om andre arter end gnavere, og fra ti rotter/køn i alle grupper så vidt muligt fra de samme rotter hver gang. Fra andre dyr end gnavere skal der tages en prøve, inden forsøget påbegyndes. Plasma fra prøverne underkastes følgende undersøgelser:

- total serumprotein
- albumin
- leverfunktionsundersøgelser (f.eks. alkalisk fosfataseaktivitet, serum alanin aminotransferase (ALAT) og serum aspartat aminotransferase (ASAT)), gamma glutamyl transpeptidase, ornitin decarboxylase
- kulhydratstofskifte, f.eks. fasteglukose
- nyrefunktionsundersøgelser f.eks. urinstof.

Makroskopisk undersøgelse

Alle dyr inklusive de dyr, som er døde under forsøget, eller som blev aflivet, fordi de var døende, underkastes en fuldstændig makroskopisk vurdering. Før aflivning tages blodprøver af alle dyr til differential tælling. Alle makroskopisk synlige læsioner, tumorer eller læsioner, som mistænkes for at være tumorer, opbevares. Makroskopiske observationer korreleres så vidt muligt med mikroskopiske fund.

Alle væv og organer bør opbevares med henblik på mikroskopisk undersøgelse. Det drejer sig normalt om følgende væv og organer: hjerne⁽¹⁾ (medulla/pons, det cerebellare og cerebrale cortex), hypofyse, skjoldbruskkirtel (inklusive biskjoldbruskkirtel), thymusvæv, lunger (inklusive trakea), hjerte, aorta, spytkirtler, lever⁽¹⁾, milt, nyre⁽¹⁾, binyrer⁽¹⁾, spiserør, mavesæk, duodenum, jejunum, ileum, cœcum, tyktarm, endetarm, uterus, urinblære, lymfeknuder, bygspytkirtel, kønskirtler⁽¹⁾, assesoriske kønskirtler, kvindelig brystkirtel, hud, muskulatur, perifer nerve, rygmarv (cervikalt, thorakalt, lumbalt), sternum med benmarv og femur (inklusive led) og øjne. Den optimale præparering af lunger og urinblærer er inflation med et fiksativ og i forbindelse med inhalationsundersøgelser er det centralt for de histopatologiske undersøgelser, at lungerne inflateres. I særlige undersøgelser som inhalationsundersøgelser bør de samlede luftveje undersøges, herunder næse, farynx og larynx.

Hvis der gennemføres andre kliniske undersøgelser, bør resultaterne af disse foreligge, før der foretages mikroskopiske undersøgelser, fordi de kan være af afgørende værdi for patologen.

Histopatologisk undersøgelse

Alle makroskopisk synlige forandringer af et hvilket som helst organ, især tumorer og andre læsioner, skal undersøges mikroskopisk. Det anbefales yderligere at foretage:

- a) Mikroskopisk undersøgelse af alle præparerede organer og væv med fuldstændig beskrivelse af alle fundne læsioner hos
 1. alle dyr, som er døde eller aflivet under forsøget, og
 2. alle dyr fra den gruppe, der er blevet eksponeret for den højeste dosis og kontrolgruppen.
- b) Organer eller væv, som udviser abnormiteter, der skyldes eller kan skyldes teststoffet, undersøges også hos de lavere doserede grupper.
- c) Såfremt forsøgsresultaterne viser betydelige ændringer i dyrenes normale levetid eller induktioner af effekter, der kan have betydning for en toksisk respons, undersøges den gruppe, der eksponeres for den næsthøjeste dosis, efter ovenstående retningslinier.
- d) En korrekt vurdering af betydningen af de forandringer, der observeres hos de eksponerede dyr, forudsætter kendskab til den normalt forekommende incidens af læsioner i den anvendte dyrestamme (under samme laboratoriebetingselser, dvs. på grundlag af tidligere opsamlede data).

⁽¹⁾ Disse organer udtages og vejes fra ti dyr pr. køn pr. gruppe, når det drejer sig om gnavere og fra alle andre dyr end gnavere. For andre dyrearter end gnavere tages desuden skjoldbruskkirtel (med biskjoldbruskkirtel), som også vejes.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, antal dyr med læsioner og for hver type af læsioner den procentdel dyr, der udviser den pågældende læsion. Evaluering af resultaterne skal baseres på en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- dyreart, stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.
- forsøgsbetingelser:

Beskrivelse af ekspositionsapparat, herunder udformning, type, dimensionering, luftkilde, system til frembringelse af partikler og aerosoler, metode til konditionering af luften, behandling af udpumpet luft og den måde, hvorpå dyrene holdes i et ekspositionskammer, når et sådan benyttes. Apparat til måling af temperatur, fugtighed og eventuelle partikulære aerosolers koncentration og partikelstørrelse beskrives.

Ekpositionsdata:

Disse skal opstilles i tabelform og angive middelværdier og variation (f.eks. standardafvigelser) og bør omfatte:

- a) lufthastighed gennem inhalationsudstyret
 - b) luftens temperatur og fugtighed
 - c) nominelle koncentrationer (total mængde teststof tilført inhalationsapparatet divideret med luftmængden)
 - d) type af vehikel, hvor et sådant er anvendt
 - e) faktiske koncentrationer i opholdsarealet under forsøget
 - f) middelværdien af partikelstørrelser (hvor dette er relevant)
- dosisniveauer (inklusive vehikel, hvor et sådant er anvendt) og koncentrationer
 - oplysning om toksisk reaktion inddelt efter køn og dosis
 - minimal virkningsfuld dosis
 - dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse til forsøgets slutning
 - beskrivelse af toksiske eller andre virkninger
 - observationstidspunkt for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten
 - data for foder og vægt
 - oftalmologiske fund
 - hæmatologiske undersøgelser og samtlige resultater
 - klinisk-biokemiske analyser og samtlige resultater (herunder resultater af urinanalyse)
 - obduktionsfund
 - detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund
 - statistisk behandling af resultaterne
 - diskussion af resultaterne
 - fortolkning af resultaterne.

3.2. Vurdering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B.

KARCINOGENICITETSUNDERSØGELSE**1. METODE****1.1. Indledning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Flere grupper af forsøgsdyr doseres normalt syv dage om ugen med teststof på passende måde. Der gives en dosis pr. gruppe i størstedelen af dyrenes levetid. Under og efter dosering med teststoffet observeres dyrene dagligt, og eventuelle tegn på toksicitet, især udvikling af tumorer, registreres.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Dyrene holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Unge, sunde, dyr fordeles randomiseret i test- og kontrolgrupper.

Forsøgsdyr

Rotten er det foretrukne forsøgsdyr. Andre dyrearter (gnavere eller ikke-gnavere) kan anvendes, hvis tidligere gennemførte undersøgelser giver grundlag herfor. Der bør benyttes unge, sunde dyr af almindeligt anvendte laboratoriestammer, og doseringen bør indledes så hurtigt som muligt, efter at dyrene er vænnet fra.

Ved forsøgets begyndelse må vægten af de anvendte dyr ikke variere mere end $\pm 20\%$ af gennemsnitsvægten. Hvis en undersøgelse af subkronisk toksicitet ved oral indgift udføres som et forstudium til en langtidsundersøgelse, bør samme dyreart og stamme anvendes i begge undersøgelser.

Antal og køn

Hvis der anvendes gnavere, skal der anvendes mindst 100 dyr (50 hun- og 50 handyr) til hvert dosisniveau samt en kontrolgruppe. Hunddyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. 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.

Dosisniveauer

Der anvendes mindst tre forskellige dosisniveauer ud over kontrolgruppen. Det højeste dosisniveau bør fremkalde minimale toksicitetstegn f.eks. en let formindskelse af legemsvægten (mindre end 10%), uden at der er tale om væsentlige ændringer af den normale levetid undtagen som følge af tumorer.

Den mindste dosis bør ikke påvirke dyrenes normale vækst, udvikling og levetid eller have nogen toksisk effekt overhovedet. I almindelighed bør denne dosis ikke være mindre end 10% af den største dosis.

Middeldosis (evt. flere) bør ligge midtvejs mellem det højeste og laveste dosisniveau.

Ved valg af dosisstørrelser bør der tages hensyn til data fra tidligere toksicitetsundersøgelser.

Dyrene doseres normalt med teststoffet hver dag.

Hvis stoffet administreres via drikkevandet eller med foderet, bør det være kontinuert tilgængeligt.

Kontrolgruppe

Der skal anvendes en kontrolgruppe, som på alle måder er identisk med forsøgsgrupperne bortset fra dosering med teststoffet.

Under særlige omstændigheder som f.eks. inhalationsundersøgelser, hvor der benyttes aerosoler, eller hvis der benyttes en emulgator med ukendt biologisk virkning i undersøgelser med oral indgift, anvendes en negativ kontrolgruppe, som ikke doseres hverken med teststoffet eller vehiklet.

Administrationsmåde

De tre hovedformer for administration af teststof er oral indgift, påføring på huden og inhalation. Valget af administrationsform afhænger af teststoffets fysiske og kemiske karakteristika og den sandsynlige måde, hvorpå mennesker ekponeres for stoffet.

Oral indgift

Hvis teststoffet absorberes i mave-tarmkanalen, og hvis mennesker kan udsættes for indtagelse gennem munden, anvendes oral indgift, medmindre der foreligger kontraindikationer. Dyrene indgives teststoffet med foderet, opløst i drikkevandet eller i kapsler.

Den ideelle dosering er, at dyrene får indgivet teststoffet, syv dage om ugen. Hvis indgift indskrænkes til fem dage om ugen, kan der ske tilbagevenden til normal, eller der kan optræde abstinenssymptomer imellem eksponeringsperioderne, hvilket kan indvirke på resultaterne og den senere vurdering. Med udgangspunkt i praktiske overvejelser kan det accepteres, at dyrene indgives teststoffet fem dage om ugen.

Påføring på huden

Kutan påføring ved hudpensling kan vælges som model ved induktion af hudlæsioner med henblik på at simulere en vigtig human ekspositionsform.

Inhalation

Inhalationsundersøgelser giver mere komplekse tekniske problemer end andre former for administrering af teststof, i det følgende gives derfor en mere detaljeret vejledning i gennemførelse af disse undersøgelser. Man bør også være opmærksom på, at intratrakeal instillation under særlige omstændigheder kan være et egnet alternativ.

Forsøg med langtidseksposition udformes normalt på grundlag af erfaringer fra arbejdspladser, således at dyrene ekponeres fem dage om ugen seks timer dagligt, efter at koncentrationen i kammeret er ækvilibreret (intermitterende eksposition), eller der benyttes eksponering på grundlag af erfaringer fra miljøet, dvs. syv dage om ugen og 22 til 24 timer pr. dag (kontinuert eksposition) med ca. en time om dagen på et bestemt klokkeslæt til fodring af dyrene og rengøring af kammeret. I begge tilfælde ekponeres dyrene normalt for fastlagte koncentrationer af teststof. En vigtig forskel mellem intermitterende og kontinuert eksposition, som man må være opmærksom på, er, at der ved den førstnævnte metode er en periode på 17 til 18 timer, hvor dyrene kan overvinde virkningerne af en daglige eksposition og en endnu længere periode i weekenderne.

Valget mellem intermitterende og kontinuert eksposition, afhænger af undersøgelsens formål og den menneskelige eksponering, der simuleres. Der er imidlertid en række tekniske vanskeligheder at tage i betragtning. F.eks. kan fordelene ved kontinuert eksponering, når det drejer sig om at simulere miljøbetingelser, falde væk på grund af behovet for vanding og fodring i ekspositionsperioden og for mere komplicerede (og pålidelige) teknikker til generering og kontrol af aerosoler og dampe.

Ekspositionskamre

Dyrene testes i ekspositionskamre, der er således udformet, at der kan opretholdes en dynamisk luftgennemstrømning på mindst tolv luftskift pr. time, samtidig med at der sikres et adækvat iltindhold og en jævnt fordelt ekspositionsluft. Kontrollkamre og ekspositionskamre bør være identiske med hensyn til konstruktion og udformning, så det sikres, at ekspositionsbetingelserne er sammenlignelige på alle måder bortset fra eksponering

for teststoffet. Der holdes normalt et let undertryk i kammeret for at forhindre, at teststoffet lækker ud i det omgivende rum. Kammeret indrettes, således at der undgås trængsel mellem forsøgsdyrene.

Den generelle regel er, at hvis der skal sikres en stabil rumatmosfære, må dyrenes totale volumen ikke overstige 5 % af ekspositions-kammerets volumen.

Der skal foretages måling og kontrol af:

- I. Luftgennemstrømning: det må foretrækkes, at luftstrømmen gennem kammeret kontrolleres kontinuerligt.
- II. Koncentrationen må i den daglige eksponeringsperiode ikke variere mere end $\pm 15\%$ af den gennemsnitlige værdi.
Under hele forsøget skal koncentrationen fra dag til dag holdes så konstant som praktisk muligt.
- III. Temperatur og fugtighed: ved anvendelse af gnavere holdes temperaturen på $22 (\pm 2^\circ \text{C})$ og fugtigheden i kammeret mellem 30 og 70 %, undtagen når der anvendes vand til suspension af teststof i kammerets atmosfære. Det må foretrækkes, at både temperatur og fugtighed kontrolleres konstant.
- IV. Måling af partikelstørrelse: hvis der anvendes atmosfære med flydende eller faste aerosoler i kammeret, bør der foretages en beregning af partikelstørrelsens distribution. Aerosolpartiklerne skal være respirable for de anvendte forsøgsdyr. Der tages prøver af kammerets atmosfære i dyrenes vejtrækningszone. Luftprøverne skal være repræsentative for den partikeldistribution, dyrene eksponeres for, og det skal gennem gravimetrisk analyse være muligt på grundlag af disse luftprøver at beskrive hele aerosolen, også selv om meget af den ikke er respirabel. Under indkøring af udstyret bør der foretages hyppige analyser af partikelstørrelsen for at sikre aerosolkoncentrationernes stabilitet. Under eksponering foretages analyser så ofte, som det er nødvendigt for en adækvat bestemmelse af, om den partikeldistribution, dyrene eksponeres for, er konstant.

Undersøgelsens varighed

En karcinogenicitetsundersøgelse omfatter størstedelen af forsøgsdyrenes normale levetid. Hvis der anvendes mus og hamstre bør forsøget vare 18 måneder, og hvis der anvendes rotter, 24 måneder. Ved anvendelse af visse dyrestammer med længere levetid og/eller en lav spontan tumorincidens bør forsøget vare 24 måneder med mus og hamstre og 30 måneder med rotter. Det kan dog accepteres, at en sådan forlænget undersøgelse afsluttes, når antallet af overlevende dyr i den gruppe, der eksponeres for den mindste dosis, eller kontrolgruppen er nede på 25 %. Hvis der er en åbenlys forskel i respons afhængig af dyrenes køn, bør hvert køn betragtes som et forsøg for sig, og forsøgets længde indrettes herefter. Hvis der kun optræder præmature dødsfald i den gruppe, som eksponeres for den højeste dosis, og hvis dette klart skyldes toksiske effekter, er det ikke nødvendigt at afslutte undersøgelsen, under forudsætning af at de toksiske effekter ikke skaber problemer i de andre grupper. Hvis et negativt testresultat skal kunne accepteres, må højst 10 % af hver gruppe falde uden for undersøgelsen på grund af autolyse af væv, kannibalisme eller forveksling, og overlevelsesprocenten i alle grupper må ikke være under 50 % efter 18 måneders forløb med anvendelse af mus og hamstre og 24 måneder med anvendelse af rotter.

Fremgangsmåde

Observation

Observation af dyrene skal omfatte forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønstret.

Dyrene inspiceres regelmæssigt for at det mindst mulige antal dyr går tabt for undersøgelsen på grund af f.eks. kannibalisme, autolyse af væv eller forveksling. Døende dyr fjernes og obduceres, når de observeres.

For alle dyrs vedkommende registreres kliniske symptomer og mortalitet. Der foretages en nøje registrering af udviklingen af tumorer. Ved alle makroskopisk synlige eller palpable tumorer registreres symptomer, lokalisering, dimensioner, fremtræden og udvikling.

Foderindtagelse (og vandforbrug, hvis teststof indgives med drikkevandet) bestemmes en gang om ugen i de første 13 uger og derefter ca. hver tredje måned, medmindre andet indiceres af helbredstilstanden eller ændringer i legemsvægten.

Dyrene vejes enkeltvis en gang om ugen i de første 13 uger af forsøgsperioden og mindst en gang hver fjerde uge derefter.

Klinisk undersøgelse

Hæmatologisk undersøgelse

Hvis observationer af dyrene tyder på, at deres helbredstilstand er blevet dårligere under forsøget, foretages en differential tælling på blodprøver fra de pågældende dyr.

Efter hhv. 12 og 18 måneders varighed samt umiddelbart før aflivning tages blod fra hvert enkelt dyr til udstrygningspræparater. Der foretages en differential tælling på prøver fra dyrene i den gruppe, som har været doseret med den højeste dosis, og fra dyrene i kontrolgruppen. Hvis resultaterne af disse analyser, især af de prøver, som tages umiddelbart inden aflivning, eller resultaterne af den patologiske undersøgelse indikerer det, udføres differential tælling på prøver fra dyr i den gruppe, der har fået den næsthøjeste dosis.

Makroskopisk undersøgelse

Alle dyr inklusive de dyr, som er døde under forsøget, eller som blev aflivet, fordi de var døende, underkastes en fuldstændig makroskopisk vurdering. Alle makroskopisk synlige tumorer eller læsioner, som mistænkes for at være tumorer, opbevares.

Følgende væv og organer opbevares i et passende medium med henblik på senere histopatologisk undersøgelse: hjerne, (herunder snit af medulla/pons, den cerebellare og cerebrale cortex), hypofyse, skjoldbrusk/biskjoldbrusk-kirtel, thymusvæv, trakea, lunger, hjerte, aorta, spytkirtler, lever, milt, nyrer, binyrer, bugspytkirtel, kønskirtler, uterus, assesoriske kønskirtler, hud, spiserør, mavesæk, duodenum, jejunum, ileum, coecum, tyktarm, endetarm, urinblære, en repræsentativ lymfeknude, kvindelig brystkirtel, lårmuskulatur, perifer nerve, sternum med benmarv, femur (inklusive ledflade), rygmarv i tre snit (cervikalt, midt for thorax og lumbalt) samt øjne.

Den optimale præparering af lunger og urinblære er inflation med et fiksativ. I forbindelse med inhalationsundersøgelser er det centralt for de histopatologiske undersøgelser, at lungerne inflateres. I inhalationsundersøgelser bør de samlede luftveje undersøges, herunder næse, farynx og larynx.

Histopatologisk undersøgelse

- a) Der skal foretages en fuldstændig histopatologisk undersøgelse af organer og væv fra dyr, som dør eller aflives under forsøget, samt dyrene i kontrolgruppen og i den gruppe, der er blevet doseret med den højeste dosis.
- b) Alle makroskopisk synlige tumorer eller læsioner, som mistænkes for at være tumorer, undersøges i alle grupper.
- c) Hvis der er signifikant forskel på de neoplastiske læsioners incidens i den højest doserede gruppe og kontrolgruppen, skal de relevante organer eller væv undersøges histopatologisk i de øvrige grupper.
- d) Hvis overlevelse i den højest doserede gruppe er væsentlig lavere end i kontrolgruppen, underkastes den gruppe, der er doseret med den næsthøjeste dosis, en fuldstændig histopatologisk undersøgelse.
- e) Hvis undersøgelsen af den højest doserede gruppe giver grund til at formode, at der er tale om induktion af toksiske eller andre effekter, som kan have betydning for et neoplastisk respons, underkastes den gruppe, der eksponeres for den næsthøjeste dosis, en fuldstændig histopatologisk undersøgelse.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, antal dyr med tumorer, som er registreret under forsøget, registreringstidspunkt og antal dyr, hos hvem der er fundet tumorer efter aflivning. Evaluering af resultaterne skal baseres på en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- dyreart, stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.

— forsøgsbetingelser:

Beskrivelse af ekspositionsapparat, herunder udformning, type, dimensionering, luftkilde, system til frembringelse af partikler og aerosoler, metode til konditionering af luften, behandling af udpumpet luft og den måde, hvorpå dyrene holdes i et ekspositionskammer, når et sådant benyttes. Apparat til måling af temperatur, fugtighed og eventuelle partikulære aerosolers koncentration og partikelstørrelse beskrives.

Ekspositionsdata:

Disse skal opstilles i tabelform og angive middelværdier og variation (f.eks. standardafvigelser) og bør omfatte:

- a) lufthastighed gennem inhalationsudstyret
 - b) luftens temperatur og fugtighed
 - c) nominelle koncentrationer (total mængde teststof tilført inhalationsapparatet divideret med luftmængden)
 - d) type af vehikel, hvor et sådant er anvendt
 - e) faktiske koncentrationer i opholdsarealet under forsøget
 - f) middelværdien af partikelstørrelser (hvor dette er relevant)
- doser (inklusive vehikel, hvor et sådant er anvendt) og koncentrationer
- oplysning om tumorincidens inddelt efter køn, dosis og tumortype
- død tidspunkt under forsøget eller overlevelse til forsøgets slutning
- oplysning om toksisk reaktion inddelt efter køn og dosis
- toksisk eller anden virkning
- observationstidspunkt for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten
- data for foder og vægt
- resultaterne af de hæmatologiske analyser
- obduktionsfund
- detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund
- statistisk behandling af resultaterne og beskrivelse af den anvendte metoder
- diskussion af resultaterne
- fortolkning af resultaterne.

3.2. **Vurdering og fortolkning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. **LITTERATURHENVISNINGER**

Se den generelle indledning til afsnit B.

KOMBINERET UNDERSØGELSE AF KARCINOGENICITET/KRØNISK TOKSICITET**1. METODE****1.1. Indledning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Formålet med en kombineret undersøgelse af kronisk toksicitet/karcinogenicitet er at bestemme et stofs kroniske og karcinogene virkninger på pattedyr efter langvarig eksponering.

Med henblik herpå, suppleres karcinogenicitetsundersøgelsen med mindst en satellitgruppe, der eksponeres for teststoffet, og en kontrolsatellitgruppe. Den dosis, som den højst doserede satellitgruppe eksponeres for, kan være større end den største dosis, der anvendes i karcinogenicitetsundersøgelsen. Dyrene i karcinogenicitetsundersøgelsen undersøges både for toksisk respons og for karcinogen respons. Dyrene i den eksponerede satellitgruppe undersøges for toksisk respons.

Flere grupper af forsøgsdyr doseres normalt syv dage om ugen med teststof på passende måde. Der gives en dosis pr. gruppe i størstedelen af dyrenes levetid. Under og efter doseringen af teststoffet observeres dyrene dagligt, og eventuelle tegn på toksicitet og udvikling af tumorer registreres.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Dyrene holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Unge, sunde, kønsmodne dyr fordeles randomiseret i test- og kontrolgrupper.

Forsøgsdyr

Rotten er det foretrukne forsøgsdyr. Andre dyrearter (gnavere eller ikke-gnavere) kan anvendes, hvis tidligere gennemførte undersøgelser giver grundlag herfor. Der bør benyttes unge, sunde dyr af almindeligt anvendte laboratoriestammer, og doseringen bør indledes så hurtigt som muligt, efter at dyrene er vænnet fra.

Ved forsøgets begyndelse må vægten af de anvendte dyr ikke variere mere end $\pm 20\%$ af gennemsnitsvægten. Hvis en undersøgelse af subkronisk toksicitet udføres som et forstudium til en langtidsundersøgelse, bør samme dyreart og stamme anvendes i begge undersøgelser.

Antal og køn

Hvis der anvendes gnavere, skal der anvendes mindst 100 dyr (50 hun- og 50 handyr) til hvert dosisniveau samt en kontrolgruppe. Hunddyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. 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.

Den (de) doserede satellitgruppe(r), der anvendes til bedømmelse af andre patologiske virkninger end tumorer, skal omfatte 20 dyr af hvert køn, mens kontrolsatellitgruppen skal omfatte ti dyr af hvert køn.

Dosisniveauer

Til testning af karcinogenicitet anvendes mindst tre forskellige dosisniveauer udover kontrolgruppen. Det højeste dosisniveau bør fremkalde minimale toksicitetstegn f.eks. en let formindskelse af legemsvægten (mindre end 10%), uden at der er tale om væsentlige ændringer af den normale levetid undtagen som følge af tumorer.

Den mindste dosis bør ikke påvirke dyrenes normale vækst, udvikling og levetid eller have nogen toksisk effekt overhovedet. I almindelighed bør denne dosis ikke være mindre end 10% af den største dosis.

Middeldosis (evt. flere) bør ligge midtvejs mellem det højeste og laveste dosisniveau.

Ved valg af dosisstørrelser bør der tages hensyn til data fra tidligere toksicitetsundersøgelser.

Med henblik på testning af kronisk toksicitet inkluderes flere forsøgsgrupper og en dertil hørende kontrolsatellitgruppe i undersøgelsen. Den højeste dosis, som dyrene i satellitgrupperne eksponeres for, bør være så høj, at den giver tydelige tegn på toksicitet.

Dyrene doseres normalt med teststoffet hver dag.

Hvis stoffet administreres via drikkevandet eller med foderet, bør det være kontinuert tilgængeligt.

Kontrolgruppe

Der skal anvendes en kontrolgruppe, som på alle måder er identisk med forsøgsgrupperne bortset fra dosering med teststoffet.

Under særlige omstændigheder som f.eks. inhalationsundersøgelser, hvor der benyttes aerosoler, eller hvis der benyttes en emulgator med ukendt biologisk virkning i undersøgelser med oral indgift, anvendes en negativ kontrolgruppe, som ikke doseres hverken med teststoffet eller vehiklet.

Administrationsmåde

De tre hovedformer for administration af teststof er oral indgift, påføring på huden og inhalation. Valget af administrationsform afhænger af teststoffets fysiske og kemiske karakteristika og den sandsynlige måde, hvorpå mennesker eksponeres for stoffet.

Oral indgift

Hvis teststoffet absorberes i mave-tarmkanalen, og hvis mennesker kan udsættes for indtagelse gennem munden, anvendes oral indgift, medmindre der foreligger kontraindikationer. Dyrene indgives teststoffet med foderet, opløst i drikkevandet eller i kapsler.

Den ideelle dosering er, at dyrene får indgivet teststoffet syv dage om ugen. Hvis indgift indskrænkes til fem dage om ugen, kan der ske tilbagevenden til normal, eller der kan optræde abstinenssymptomer imellem eksponeringsperioderne, hvilket kan indvirke på resultaterne og den senere vurdering. Med udgangspunkt i praktiske overvejelser, kan det accepteres, at dyrene indgives teststoffet fem dage om ugen.

Påføring på huden

Kutan påføring ved hudpensling kan vælges som model ved induktion af hudlæsioner med henblik på at simulere en vigtig human ekspositionsform.

Inhalation

Inhalationsundersøgelser giver mere komplekse tekniske problemer end andre former for administrering af teststof. I det følgende gives derfor en mere detaljeret vejledning i gennemførelse af disse undersøgelser. Man bør også være opmærksom på, at intratrakeal instillation under særlige omstændigheder kan være et egnet alternativ.

Forsøg med langtidseksposition udformes normalt på grundlag af erfaringer fra arbejdspladser, således at dyrene eksponeres fem dage om ugen seks timer dagligt, efter at koncentrationen i kammeret er ækvilibreret (intermitterende eksposition), eller der benyttes eksponering på grundlag af erfaringer fra miljøet, dvs. syv dage om ugen og 22 til 24 timer pr. dag (kontinuert eksposition) med ca. en time om dagen på et bestemt klokkeslæt til fodring af dyrene og rengøring af kammeret. I begge tilfælde eksponeres dyrene normalt for fastlagte koncentrationer af teststof. En vigtig forskel mellem intermitterende og kontinuert eksposition, som man må være opmærksom på, er, at der ved den førstnævnte metode er en periode på 17 til 18 timer, hvor dyrene kan overvinde virkningerne af den daglige eksposition og en endnu længere periode i weekenderne.

Valget mellem intermitterende og kontinuert eksposition afhænger af undersøgelsens formål og den menneskelige eksponering, der simuleres. Der er imidlertid en række tekniske vanskeligheder at tage i betragtning. F.eks. kan fordelene ved kontinuert eksponering, når det drejer sig om at simulere miljøbetingelser, falde væk på grund af behovet for vanding og fodring i ekspositionsperioden og for mere komplicerede (og pålidelige) teknikker til generering og kontrol af aerosoler og dampe.

Ekspositionskamre

Dyrene testes i ekspositionskamre, der er således udformet, at der kan opretholdes en dynamisk luftgennemstrømning på mindst tolv luftskift pr. time, samtidig med at der sikres et adækvat iltindhold og en jævnt fordelt ekspositionsluft. Kontrolkamre og ekspositionskamre bør være identisk med hensyn til konstruktion og udformning, så det sikres, at ekspositionsbetingelserne er sammenlignelige på alle måder bortset fra eksponering for teststoffet. Der holdes normalt et let undertryk i kammeret for at forhindre, at teststoffet lækker ud i det omgivende rum. Kammeret indrettes, således at der undgås trængsel mellem forsøgsdyrene. Den generelle regel er, at hvis der skal sikres en stabil rumatmosfære, må dyrenes totale volumen ikke overstige 5 % af ekspositionskammerets volumen.

Der skal foretages måling og kontrol af:

- I. Luftgennemstrømning: det må foretrækkes, at luftstrømmen gennem kammeret kontrolleres kontinuerligt.
- II. Koncentrationen må i den daglige eksponeringsperiode ikke variere mere end $\pm 15\%$ af den gennemsnitlige værdi.

Under hele forsøget skal koncentrationen fra dag til dag holdes så konstant som praktisk muligt.

- III. Temperatur og fugtighed: ved anvendelse af gnavere holdes temperaturen på $22 (\pm 2^\circ \text{C})$ og fugtigheden i kammeret mellem 30 og 70 % undtagen når der anvendes vand til suspension af teststof i kammerets atmosfære. Det må foretrækkes, at både temperatur og fugtighed kontrolleres konstant.
- IV. Måling af partikelstørrelse: hvis der anvendes atmosfærer med flydende eller faste aerosoler i kammeret, bør der foretages en beregning af partikelstørrelsens distribution. Aerosolpartiklerne skal være respirable for de anvendte forsøgsdyr. Der tages prøver af kammerets atmosfære i dyrenes vejtrækningszone. Luftprøverne skal være repræsentative for den partikeldistribution, dyrene eksponeres for, og det skal gennem gravimetrisk analyse være muligt på grundlag af disse luftprøver at beskrive hele aerosolen, også selv om meget af den ikke er respirabel. Under indkøring af udstyret bør der foretages hyppige analyser af partiklernes størrelse for at sikre aerosolkoncentrationernes stabilitet. Under eksponering foretages analyser, så ofte som det er nødvendigt for en adækvat bestemmelse af, om den partikeldistribution, dyrene eksponeres for, er konstant.

Undersøgelsens varighed

Varigheden af den del af undersøgelsen, der drejer sig om karcinogenicitet, omfatter størstedelen af forsøgsdyrenes normale levetid. Hvis der anvendes mus og hamstre, bør forsøget vare 18 måneder, og hvis der anvendes rotter 24 måneder. Ved anvendelse af visse dyrestammer med længere levetid og/eller en lav spontan tumorincidens, bør forsøget vare 24 måneder med mus og hamstre og 30 måneder med rotter. Det kan dog accepteres, at en sådan forlænget undersøgelse afsluttes, når antallet af overlevende dyr i den gruppe, der doseres på det laveste dosisniveau, eller kontrolgruppen er nede på 25 %. Hvis der er åbenlys forskel i respons afhængig af dyrenes køn, bør hvert køn betragtes som et forsøg for sig, og forsøgets varighed indrettes herefter. Hvis der kun optræder præmature dødsfald i den gruppe, som doseres på det højeste dosisniveau, og hvis dette klart skyldes toksiske effekter, er det ikke nødvendigt at afslutte undersøgelsen, under forudsætning af at de toksiske effekter ikke skaber problemer i de andre grupper. Hvis et negativt testresultat skal kunne accepteres, må højst 10 % af hver gruppe falde uden for undersøgelsen på grund af autolyse af væv, kannibalisme eller forveksling, og overlevelsesprocenten i alle grupper må ikke være under 50 % efter 18 måneders forløb ved anvendelse af mus og hamstre og 24 måneder ved anvendelse af rotter.

Satellitgrupperne, som består af 20 doserede dyr pr. køn og en kontrolgruppe på ti dyr pr. køn, og som anvendes til undersøgelse af kronisk toksicitet, holdes under forsøgsbetingelser i mindst tolv måneder. Tidspunktet for aflivning af disse dyr bør fastsættes ud fra en vurdering af patologiske fund relateret til teststof, og således at eventuelle geriatriske forandringer ikke griber forstyrrende ind.

Fremgangsmåde

Observationer

Dyrene inspiceres dagligt for forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønstre.

Dyrene i den (de) doserede satellitgruppe(r) skal undersøges klinisk med passende mellemrum.

Dyrene inspiceres regelmæssigt for at det mindst mulige antal dyr går tabt for undersøgelsen på grund af f.eks. kannibalisme, autolyse af væv eller forveksling. Døende dyr fjernes og obduceres, når de observeres.

Kliniske symptomer, herunder neurologiske forandringer og forandringer i øjne samt mortalitet, registreres for alle dyr. Der foretages en nøje registrering af udviklingen af tumorer. De første symptomer og udvikling af toksicitetstegn registreres. Ved alle makroskopisk synlige eller palpable tumorer registreres de første symptomer, lokalisering, dimension, fremtræden og udvikling. Foderindtagelse (og vandforbrug, hvis teststoffet indgives via drikkevandet) bestemmes en gang ugen i de første 13 uger og derefter ca. hver tredje måned, medmindre andet indiceres af helbredstilstanden eller ændringer i legemsvægten.

Dyrene vejes enkeltvis en gang om ugen i de første 13 uger af forsøgsperioden, og mindst en gang hver fjerde uge derefter.

Kliniske undersøgelser

Hæmatologisk undersøgelse

Hæmatologisk undersøgelse (f.eks. hæmoglobinkoncentration, hæmatokrit, erytrocyttælling, total leukocytælling, blodpladetælling og målinger af koaguleringssevnen) udføres efter tre måneder, seks måneder og derefter ca. hver sjette måned samt ved forsøgets afslutning på blodprøver fra ti rotter pr. køn i alle grupper. Hvis det er muligt, skal prøverne tages fra de samme rotter hver gang.

Hvis kliniske observationer af dyrene tyder på, at deres helbredstilstand er blevet dårligere under forsøget, foretages en differential tælling på prøver fra de pågældende dyr. Der foretages en differential tælling på prøver fra dyrene i den gruppe, som har været doseret med den højeste dosis, og fra dyrene i kontrolgruppen. Der udføres kun differential tælling på prøver fra dyrene i den gruppe, der har fået den næsthøjeste dosis, hvis der er stor forskel på den højest doserede gruppe og kontrolgruppen, eller hvis den patologiske undersøgelse indikerer det.

Urinanalyse

Der indsamles urinprøver til analyse fra ti rotter pr. køn i alle grupper om muligt fra de samme rotter hver gang og med samme intervaller som de ovenfor nævnte blodprøver. Følgende undersøgelser gennemføres på prøver enten fra enkelte dyr eller for rotters vedkommende på en samlet urinprøve/køn/gruppe:

- udseende: rumfang og vægtfylde for hvert enkelt dyr
- protein, glukose, ketonstof, hæmaturi (semikvantitativt), og
- sedimentmikroskopi (semikvantitativt).

Klinisk-kemisk undersøgelse

Der udtages blodprøver til klinisk-kemisk undersøgelse med ca. seks måneders mellemrum og ved forsøgets afslutning fra hvert enkelt dyr, såfremt det drejer sig om andre arter end gnavere, og fra ti rotter/køn i alle grupper så vidt muligt fra de samme rotter hver gang. Fra andre dyr end gnavere skal der tages en prøve inden forsøget påbegyndes. Plasma fra prøverne underkastes følgende undersøgelser:

- total serumprotein
- albumin
- leverfunktionsundersøgelser (f.eks. alkalisk fosfataseaktivitet, serum alanin aminotransferase (ALAT) og serum aspartat aminotransferase (ASAT)), gamma glutamyl transpeptidase, ornitin decarboxylase
- kulhydratstofskifte f.eks. fasteglukose
- nyrefunktionsundersøgelser f.eks. urinstof.

Makroskopisk undersøgelse

Alle dyr inklusive de dyr, som er døde under forsøget, eller som blev aflivet, fordi de var døende, underkastes en fuldstændig makroskopisk vurdering. Før aflivning tages blodprøver af alle dyr til differential tælling. Alle makroskopisk synlige læsioner, tumorer, som mistænkes for at være tumorer, opbevares. Makroskopiske observationer korreleres så vidt muligt med mikroskopiske fund.

Alle væv og organer bør opbevares med henblik på mikroskopisk undersøgelse. Det drejer sig normalt om følgende væv og organer: hjerne ⁽¹⁾ (medulla/pons, det cerebellare og cerebrale cortex), hypofyse, skjoldbruskkirtel (inklusive biskjoldbruskkirtel), thymusvæv, lunger (inklusive trakea), hjerte, aorta, spytkirtler, lever ⁽¹⁾, milt, nyrer ⁽¹⁾, binyrer ⁽¹⁾, spiserør, mavesæk, duodenum, jejunum, ileum, coecum, tyktarm, uterus, urinblære, lymfeknuder, bugspytkirtel, kønskirtler ⁽¹⁾, assesoriske kønskirtler, kvindelig brystkirtel, hud, muskulatur, perifer nerve, rygmarv (cervikalt, thorakalt, lumbalt), sternum med benmarv og femur (inklusive led) og øjne. Den optimale præparering af lunger og urinblære er inflation med et fiksativ, og i forbindelse med inhalationsundersøgelser er det centralt for de histopatologiske undersøgelser, at lungerne inflateres. I særlige undersøgelser som inhalationsundersøgelser bør de samlede luftveje undersøges, herunder næse, farynx og larynx.

Hvis der gennemføres andre kliniske undersøgelser, bør resultaterne af disse foreligge, før der foretages mikroskopiske undersøgelser, fordi de kan være af afgørende værdi for patologen.

Histopatologisk undersøgelse

For den del af undersøgelsen, der drejer sig om kronisk toksicitet

Der bør foretages en detaljeret undersøgelse af alle opbevarede organer fra dyr i den højest doserede satellitgruppe og kontrolgruppen. Hvis der findes patologiske tegn, som kan relateres til teststoffet i den højest doserede satellitgruppe, underkastes målorganerne hos dyrene i de øvrige doserede satellitgrupper samt de doserede grupper i den del af undersøgelsen, der drejer sig om karcinogenicitet, en fuldstændig og detaljeret histologisk undersøgelse ved forsøgets afslutning.

For den del af undersøgelsen, der drejer sig om karcinogenicitet

- a) Der skal foretages en fuldstændig histopatologisk undersøgelse af organer og væv fra de dyr, som dør eller aflives under forsøget, samt dyrene i kontrolgruppen og i den gruppe, der er blevet doseret med den højeste dosis.
- b) Alle makroskopisk synlige tumorer eller læsioner, som mistænkes for at være tumorer, undersøges.
- c) Hvis der er signifikant forskel på de neoplastiske læsioners incidens i den højest doserede gruppe og kontrolgrupper, skal de relevante organer og væv undersøges histopatologisk i de øvrige grupper.
- d) Hvis overlevende i den højest doserede gruppe er væsentlig lavere end i kontrolgruppen, underkastes den gruppe, der er doseret med den næsthøjeste dosis, en fuldstændig histopatologisk undersøgelse.
- e) Hvis undersøgelsen af den højest doserede gruppe giver grund til at formode, at der er tale om induktion af toksiske eller andre effekter, som kan have betydning for et neoplastisk respons, underkastes den gruppe, der eksponeres for den næsthøjeste dosis, en fuldstændig histopatologisk undersøgelse.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, antal dyr med tumorer eller toksisk reaktion, som er registreret under forsøget, registreringstidspunkt og antal dyr, hos hvem der er fundet tumorer efter aflivning. Evaluering af resultaterne skal baseres på en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— dyreart, stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.

⁽¹⁾ Disse organer udtages og vejes fra ti dyr pr. køn pr. gruppe, når det drejer sig om gnavere.

— forsøgsbetingelser:

Beskrivelse af ekspositionsapparatet,

herunder udformning, type, dimensionering, luftkilde, system til frembringelse af partikler og aerosoler, metode til konditionering af luften, behandling af udpumpet luft og den måde, hvorpå dyrene holdes i et ekspositionskammer, når et sådant benyttes. Apparatet til måling af temperatur, fugtighed og eventuelle partikulære aerosolers koncentrationer og partikelstørrelse beskrives.

Ekspositionsdata:

Disse skal opstilles i tabelform og angive middelværdier og variation (f.eks. standardafvigelser) og bør omfatte:

- a) lufthastighed gennem inhalationsudstyret
- b) luftens temperatur og fugtighed
- c) nominelle koncentrationer (total mængde teststof tilført inhalationsapparatet divideret med luftmængden)
- d) type af vehikel, hvor et sådant er anvendt
- e) faktiske koncentrationer i opholdsarealet under forsøget
- f) middelværdien af partikelstørrelser (hvor dette er relevant)

— dosisniveauer (inklusive vehikel, hvor et sådant er anvendt) og koncentrationer

— oplysning om tumorincidens inddelt efter køn, dosis og tumortype

— dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse til forsøgets afslutning, inklusive satellitgruppen

— oplysning om toksisk respons inddelt efter køn og dosis

— toksisk eller anden virkning

— observationstidspunkt for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten

— oftalmologiske fund

— data for foder og vægt

— hæmatologiske analyser og samtlige resultater

— resultaterne af de klinisk-biokemiske analyser (herunder urinanalyse)

— obduktionsfund

— detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— statistisk behandling af resultaterne og beskrivelse af den anvendte metode

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. **Vurdering og fortolkning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. **LITTERATURHENVISNINGER**

Se den generelle indledning til afsnit B.

REPRODUKTIONSTOKSICITETSUNDERSØGELSE I EN GENERATION

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Flere grupper af han- og hundyr doseres med teststoffet, idet der gives en dosis pr. gruppe. Hundyr doseres under væksten og under mindst en fuldstændig spermiedannelsescyklus (ca. 56 dage for mus og 70 dage for rotter) med henblik på at fremkalde sundhedsmæssige uønskede virkninger, teststoffet måtte have på spermatogenesisen.

Hundyr i F_0 -generationen doseres i mindst to fuldstændige østrale perioder for at fremkalde de skadelige virkninger, teststoffet eventuelt måtte have på brunsten. Derefter parres dyrene. Begge køn doseres med teststof i parringsperioden, og derefter doseres kun hunddyrene i drægtighedsperioden og laktationsperioden.

Hvis dosering med teststof foregår ved inhalation, kræves ændringer af metoden.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Unge, sunde, kønsmodne dyr fordeles randomiseret i grupper. Dyrene holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Det anbefales, at teststoffet administreres med foderet eller drikkevandet. Andre former for administration kan også accepteres. Alle dyr skal doseres på samme måde i hele forsøgsperioden. Hvis der anvendes et vehikel eller andre tilsætningsstoffer for at lette doseringen, skal det være påvist, at de ikke har nogen toksisk virkning. Dyrene skal doseres med teststoffet syv dage om ugen.

*Forsøgsdyr**Valg af dyreart*

Rotten eller musen er de foretrukne forsøgsdyr. Stammen bør ikke have en lav fertilitet. Der benyttes sunde dyr, som ikke tidligere har været anvendt i forsøg. Forsøgsdyrene bør være velbeskrevne med hensyn til art, stamme, køn, vægt og/eller alder.

For at få en adækvat vurdering af fertilitet skal både han- og hundyr undersøges. Alle dyr i forsøgsgrupper og kontrolgrupper skal være fravænet, før dosering påbegyndes.

Antal og køn

Hver enkelt forsøgs- og kontrolgruppe skal indeholde tilstrækkelig mange dyr, til at der kan findes ca. 20 drægtige hundyr, som er nær ved eller på fødetidspunktet.

Formålet hermed er at sikre, at der produceres tilstrækkelig meget afkom, til at der kan foretages en meningsfuld vurdering af teststoffets potentielle virkning på fertilitet, drægtighed og moderdyrenes adfærd i F_0 -generationen samt dieadfærd, vækst og udvikling i F_1 -generationen fra undfangelse til dyrene er vænnet fra.

Forsøgsbetingelser

Foder og vand gives ad libitum. Når fødetidspunktet nærmer sig, placeres de drægtige hundyr i hvert sit bur, idet der benyttes fødebure eller yngelbure, og dyrene kan eventuelt forsynes med materiale til redebygning.

Dosisniveauer

Der anvendes mindst tre forskellige dosisniveauer samt en kontrolgruppe. Hvis der anvendes et vehikel, doseres kontrolgruppen med samme mængde vehikel som den gruppe, der modtager den højeste dosis. Hvis et teststof fører til formindsket foderindtagelse eller interfererer med absorption og stofskifte, kan det være nødvendigt at anvende en kontrolgruppe, som er matchet med hensyn til foder. Medmindre der optræder begrænsninger som følge af teststoffets fysisk-kemiske natur eller biologiske egenskaber, bør den højeste dosis forårsage toksisk virkning, men ikke dødsfald i forældre (F_0)-generationen. Middeldosis (evt. flere) bør fremkalde de mindste konstaterbare toksiske virkninger af teststoffet, og den laveste dosis bør ikke have nogen toksisk effekt hverken på forældregenerationen eller afkommet. Hvis stoffet indgives med mavesonde eller i kapsel, bør den dosis, som hvert enkelt dyr modtager, udregnes på grundlag af dyrets legemsvægt og ugentligt tilpasses ændringer i denne legemsvægt. Dosering af drægtige hundyr kan baseres på legemsvægten på dag 0 eller 6, hvis man ønsker det.

Grænsetest

Hvis der ikke konstateres nogen virkning på reproduktionen ved en dosis på mindst 1 000 mg/kg af et lavtoksisk stof, kan yderligere testning betragtes som unødvendig. Hvis en indledende undersøgelse, hvor kun den højeste dosis benyttes, klart viser toksisk virkning på moderdyret, men ikke har nogen skadelig virkning på fertiliteten, kan yderligere testning betragtes som unødvendig.

Fremgangsmåde

Forsøgsplan

Daglig dosering af forældre (F_0)-generationen indledes, når dyrene er mellem fem og ni uger gamle, og efter at de er vænnet fra og akklimatiseret i mindst fem dage. Hvis der anvendes rotter, fortsættes doseringen i ti uger før parringsperioden (ved mus otte uger). Handyrerne skal enten aflives og undersøges efter parringsperioden, eller man kan fortsætte med at indgive dem teststoffet frem til en mulig produktion af et andet kuld, hvorefter de aflives og undersøges, et stykke tid før undersøgelsen afsluttes. Dosering af forældregenerationens hundyr indledes efter mindst fem dages akklimatisering og fortsætter mindst to uger før parring. Daglig dosering af F_0 -hundyrerne fortsættes gennem den tre uger lange parringsperiode, drægtighedsperioden og op til F_1 -generationen er vænnet fra. Man bør overveje eventuelle ændringer i forsøgsplanen, hvis der foreligger informationer om teststoffet fra specielle stofskifteundersøgelser eller undersøgelse af akkumulation.

Parring

Der kan anvendes parring i forholdet 1:1 (et handyr og et hundyr) eller 1:2 (et handyr og to hundyr) i undersøgelser af reproduktionstoksicitet.

Anvendes 1:1 parring, anbringes et hundyr med et handyr, indtil der indtræder drægtighed, eller tre uger er gået. Hver morgen undersøges hundyrerne for tilstedeværelse af sperma eller vaginalprop. Drægtighedsperiodens dag 0 fastlægges under hensyntagen til spermatogenesisen som den dag, hvor der observeres vaginalprop eller sperma.

De par, som ikke parrer sig, bør undersøges for fastlæggelse af årsagen til den tilsyneladende ufrugtbarhed. Dette kan gøres ved, at dyrene f.eks. får lejlighed til at parre sig med han- eller hundyr, hvis frugtbarhed er påvist, ved mikroskopisk undersøgelse af reproduktionsorganerne og ved undersøgelse af den østrale periode eller spermatogenesisen.

Kuldstørrelse

De dyr, som doseres i fertilitetsundersøgelsen, bør have lov til at yngle normalt og pleje deres afkom frem til afvæanning uden standardisering.

Hvis der gennemføres standardisering, foreslås følgende fremgangsmåde. Mellem dag 1 og 4 efter fødslen, standardiseres hvert kuld, ved at overskydende unger fjernes, således at hvert kuld kommer så tæt som muligt på at bestå af fire handyr og fire hundyr.

Hvis det på grund af antallet af han- og hundyr ikke er muligt at standardisere hvert kuld, så det indeholder fire af hvert køn, kan delvis standardisering accepteres (f.eks. fem handyr og tre hundyr). Der foretages ikke standardisering af kuld på mindre end otte unger.

Observation

Dyrene inspiceres mindst en gang om dagen under hele forsøget. Relevante adfærdsændringer, tegn på vanskelig eller forlænget fødsel og alle toksicitetstegn herunder mortalitet, registreres. Før og under parringsperioden registreres foderindtagelsen ugentligt. I drægtighedsperioden kan foderindtagelsen (og vandindtagelsen, hvis teststoffet administreres heri) registreres dagligt. Efter fødslen og i dieperioden måles foderindtagelsen på de samme dage, som kuldene vejes. Han- og hundyr af F_0 -generationen vejes den dag, doseringen indledes og derefter en gang om ugen. Disse observationer bør rapporteres individuelt for hvert enkelt udvokset dyr.

Drægtighedsperioden beregnes fra dag 0. Hvert kuld undersøges så hurtigt som muligt efter fødslen for at fastslå ungerens antal og køn, antal dødfødte og levendefødte og forekomst af makroskopisk synlige abnormiteter.

Døde unger og unger, som aflives på dag 4, skal opbevares og undersøges for mulige defekter. Levende unger tælles, og kuldet vejes morgenen efter fødslen, på dag 4 og dag 7, og derefter en gang om ugen indtil undersøgelsens afslutning, hvor dyrene skal vejes individuelt. Fysiske eller adfærdsmæssige abnormiteter, som observeres hos hunddyrene eller afkommet skal registreres.

Patologisk undersøgelse

Makroskopisk undersøgelse

F_0 -generationsdyr, som aflives efter eller dør under forsøget, undersøges makroskopisk med henblik på konstatering af strukturelle abnormiteter eller patologiske forandringer, idet opmærksomheden særlig rettes mod reproduktionssystemet. Døde eller døende unger undersøges for defekter.

Histopatologisk undersøgelse

Ovarier, uterus, cervix, vagina, testikler, bitestikler, sædblærer, prostata, accessoriske kønskirtler, hypofyse og målorgan(er) fra alle dyr i F_0 -generationen præpareres med henblik på mikroskopisk undersøgelse. Skulle det undtagelsesvist forekomme, at disse organer endnu ikke har været underkastet undersøgelse i andre forsøg med multipel dosering, undersøges organerne fra dyrene i den gruppe, der har modtaget den højeste dosis, og i kontrolgruppen samt de dyr, som er døde under forsøget, mikroskopisk, hvis det er praktisk muligt.

Hvis der konstateres abnormiteter i organer fra disse dyr, undersøges disse organer også hos alle andre dyr i F_0 -generationen. Der foretages i så fald mikroskopisk undersøgelse af alle væv, som udviser makroskopisk patologiske forandringer. Som anført i afsnittet parring kan reproduktionsorganerne fra dyr, som formodes at være ufrugtbare, også underkastes mikroskopisk undersøgelse.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, antal frugtbare handyr, antal drægtige hundyr, typer af forandringer og den procentdel dyr, som udviser hver enkelt type forandring. Evaluering af resultaterne baseres så vidt muligt på en passende statistisk metode. Enhver anerkendt statistisk metode kan anvendes.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- anvendt dyreart/stamme
- oplysning om toksisk respons inddelt efter køn og dosis, herunder fertilitet, drægtighed og afkommets levedygtighed

- dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse til forsøgets afslutning eller planlagt aflivningstidspunkt
- tabel med angivelse af vægten af hvert enkelt kuld, ungerne gennemsnitlige vægt og hver enkelt unges vægt ved forsøgets afslutning
- toksisk eller anden virkning på reproduktion, afkom, postnatal vækst
- observationstidspunkt for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten
- data for foder- og legemsvægt for F₀-generationen
- obduktionsfund
- detaljeret beskrivelse af alle mikroskopiske fund
- eventuel statistisk behandling af resultaterne
- diskussion af resultaterne
- fortolkning af resultaterne.

3.2. **Vurdering og fortolkning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. **LITTERATURHENVISNINGER**

Se den generelle indledning til afsnit B.

REPRODUKTIONSTOKSICITETSUNDERSØGELSE I TO GENERATIONER

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Flere grupper af han- og hundyr doseres med teststoffet, idet der gives en dosis pr. gruppe. F_0 -generationens hundyr doseres under væksten og under mindst en fuldstændig spermiedannelsescyklus (ca. 56 dage for mus og 70 dage for rotter) med henblik på at fremkalde sundhedsmæssige uønskede virkninger, teststoffet eventuelt måtte have på spermatogenesis. Hundyrene i F_0 -generationen doseres i mindst to fuldstændige østrale perioder med henblik på at fremkalde de skadelige virkninger, teststoffet eventuelt måtte have på brunsten. Når F_1 -generationen er fravænnet, doseres den med teststoffet gennem hele væksten, parringsperioden og produktionen af en F_2 -generation, frem til F_2 -generationen er fravænnet. Hvis dosering for teststof foregår ved inhalation kræves ændringer af metoden.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Sunde dyr fordeles randomiseret i test- og kontrolgrupper. Dyrene i forældre (F_0)-generationen holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Det anbefales, at teststoffet administreres med foderet eller drikkevandet. Andre former for administrering kan også accepteres. Alle dyr skal doseres på samme måde i hele forsøgsperioden. Hvis der anvendes et vehikel eller andre tilsætningsstoffer for at lette doseringen, bør det være påvist, at de ikke har nogen toksisk virkning. Dyrene skal doseres for teststoffet syv dage om ugen.

Forsøgsdyr: Valg af dyreart

Rotten eller musen er de foretrukne forsøgsdyr. Stammen bør ikke have en lav fertilitet. Til F_0 -generationen benyttes sunde dyr, som ikke tidligere har været anvendt i forsøg. Forsøgsdyrene bør være velbeskrevne med hensyn til art, stamme, køn, vægt og/eller alder.

For at få en adækvat vurdering af fertilitet skal både han- og hundyr undersøges. Alle dyr i forsøgsgrupper og kontrolgrupper skal være fravænnet, før dosering påbegyndes.

Antal og køn

Hver enkelt forsøgs- og kontrolgruppe skal indeholde tilstrækkelig mange dyr, til at der kan findes ca. 20 drægtige hundyr, som er nær ved eller på fødetidspunkter. Formålet hermed er at sikre, at der produceres tilstrækkelig meget afkom, til at der kan foretages en meningsfuld vurdering af teststoffets potentielle virkning på fertilitet, drægtighed

og moderdyrenes adfærd samt adfærd, vækst og udvikling i F₁-generationen fra undfangelse til fuldt udvokset og udviklingen af F₂-generationen, frem til dyrene er vænnet fra.

Forsøgsbetingelser

Foder og vand gives ad libitum. Når fødetidspunktet nærmer sig, placeres de drægtige hunde i hvert sit bur, idet der benyttes fødebure eller yngelbure, og dyrene kan eventuelt forsynes med materiale til redebygning.

Dosisniveauer

Der anvendes mindst tre forskellige dosisniveauer samt en kontrolgruppe. Hvis der anvendes et vehikel, doseres kontrolgruppen med samme mængde vehikel som den gruppe, der modtager den højeste dosis. Hvis et teststof fører til formindsket foderindtagelse eller interfererer med absorption og stofskifte, kan det være nødvendigt at anvende en kontrolgruppe, som er matchet med hensyn til foder. Medmindre der optræder begrænsninger som følge af teststoffets fysisk-kemiske natur eller biologiske egenskaber, bør den højeste dosis forårsage toksisk virkning, men ikke dødsfald i forældre (F₀)-generationen. Middeldosis (evt. flere) bør fremkalde de laveste konstaterbare toksiske virkninger af teststoffet, og den mindste dosis bør ikke have nogen toksisk effekt hverken på forældre (F₀)-generationen eller afkommet. Hvis stoffet indgives med mavesonde eller i kapsel, bør den dosis, som hvert enkelt dyr modtager, udregnes på grundlag af dyrets legemsvægt og ugentligt tilpasses ændringer i denne legemsvægt. Dosering af drægtige hunde kan baseres på legemsvægten på dag 0 eller 6, hvis man ønsker det.

Grænsetest

Hvis der ikke konstateres nogen virkning på reproduktionen ved en dosis på mindst 1 000 mg/kg af et lavtoksisk stof, kan yderligere testning betragtes som unødvendig. Hvis en indledende undersøgelse, hvor kun den højeste dosis benyttes, klart viser toksisk virkning på moderdyret, men ikke har nogen skadelige virkninger på fertiliteten, kan yderligere testning betragtes som unødvendig.

Fremgangsmåde

Forsøgsplan

Daglig dosering af forældre (F₀)-generationen indledes, når dyrene er mellem fem og ni uger gamle, og efter at de er vænnet fra og akklimatiseret i mindst fem dage. Hvis der anvendes rotter, fortsætter eksponeringen i ti uger før parringsperioden (ved mus otte uger). Hundene skal enten aflives og undersøges efter parringsperioden, eller man kan fortsætte med at indgive dem teststoffet frem til en mulig produktion af et andet kuld, hvorefter de aflives og undersøges, et stykke tid før undersøgelsen afsluttes.

Dosering af forældre (F₀)-generationens hunde påbegyndes efter mindst fem dages akklimatisering og fortsætter mindst to uger før parring. Daglig dosering af F₀-hundene fortsættes gennem den tre uger lange parringsperiode, drægtighedsperioden og op til F₁-generationen er fravænnet. Man bør overveje eventuelle ændringer i forsøgsplanen, hvis der foreligger informationer om teststoffet fra specielle stofskifteundersøgelser eller undersøgelse af akkumulation.

Dosering af F₁-generationen indledes, når den er vænnet fra, og fortsættes, til dyrene aflives.

Parring

Der kan anvendes parring i forholdet 1:1 (et hund og et hund) eller 1:2 (et hund og to hund) i undersøgelse af reproduktionstoksicitet. Anvendes 1:1 parring, anbringes et hund med et hund, indtil der indtræder drægtighed, eller tre uger er gået. Hver morgen undersøges hundene for tilstedeværelse af sperma eller vaginalprop. Drægtighedsperiodens dag 0 fastlægges til den dag, hvor der observeres vaginalprop eller sperma.

Under hensyntagen til spermatogenesisen bør F₁-generationen ikke parres, før dyrene er mindst 11 uger gamle, hvis det drejer sig om mus, og 13 uger, hvis det drejer sig om rotter. Ved parring af F₁-generationen udvælges et hund og et hund tilfældigt fra hvert kuld og krydses med et hund fra et andet kuld inden for samme forsøgsgruppe med henblik på produktion af F₂-generationen. Den han- og hund fra F₁-generationen, som ikke udvælges til parring, aflives, når de er fravænnet.

De par, som ikke parrer sig, bør undersøges for fastlæggelse af årsagen til den tilsyneladende ufrugtbarhed. Dette kan gøres, ved at dyrene f.eks. får lejlighed til at parre sig med han- eller hundyr, hvis frugtbarhed er påvist, ved mikroskopisk undersøgelse af reproduktionsorganerne og ved undersøgelse af den østrale periode eller spermatogenesisen.

Kuldstørrelse

De dyr, som doseres i fertilitetsundersøgelsen, bør have lov at yngle normalt og pleje deres afkom frem til afvæning uden standardisering.

Hvis der gennemføres standardisering foreslås følgende fremgangsmåde. Mellem dag 1 og 4 efter fødslen standardiseres hvert kuld, ved at overskydende unger fjernes, således at hvert kuld kommer så tæt på som muligt på at bestå af fire handyr og fire hundyr. Hvis det på grund af antallet af han- og hundyr ikke er muligt at standardisere hvert kuld, så at det indeholder fire af hvert køn, kan delvis standardisering accepteres (f.eks. fem handyr og tre hundyr). Der foretages ikke standardisering af kuld på mindre end otte unger. F₂-generationens kuld standardiseres på samme måde.

Observation

Dyrene inspiceres mindst en gang om dagen under hele forsøget. Relevante adfærdsændringer, tegn på vanskelig eller forlænget fødsel og alle toksicitetstegn herunder mortalitet, registreres. Før og under parringsperioden registreres foderindtagelsen ugentligt. I drægtighedsperioden kan foderindtagelsen registreres dagligt. Efter fødslen og i dieperioden måles foderindtagelsen på de samme dage, som kuldene vejes. Forældregenerationsdyr (F₀ og F₁) vejes, den dag doseringen indledes, og derefter en gang om ugen. Disse observationer bør rapporteres individuelt for hvert enkelt udvokset dyr.

Drægtighedsperioden beregnes fra dag 0. Hvert kuld undersøges så hurtigt som muligt efter fødslen for at fastslå ungerne antal og køn, antal dødfødte og levendefødte og forekomsten af makroskopisk synlige abnormiteter. Døde unger og unger, som aflives på dag 4, opbevares og undersøges for mulige defekter.

Levende unger tælles, og kullet vejes morgenen efter fødslen, på dag 4 og dag 7 og derefter en gang om ugen indtil undersøgelsens afslutning, hvor dyrene skal vejes individuelt. Fysiske eller adfærdsmæssige abnormiteter, som observeres hos hunddyrene eller afkommet, skal registreres.

Patologisk undersøgelse

Makroskopisk vurdering

Dyrene i F₀- og F₁-generationerne aflives, så snart de ikke længere er nødvendige for undersøgelsen af reproduktionen. Afkom i F₁-generationen, som ikke udvælges til parring, samt alt afkom i F₂-generationen aflives, når de er fravænet.

F₀- og F₁-generationsdyr, som aflives efter eller dør under forsøget, undersøges mikroskopisk for konstatering af strukturelle abnormiteter eller patologiske forandringer, idet opmærksomheden særlig rettes mod reproduktions-systemet. Døde eller døende unger skal undersøges for defekter.

Histopatologisk undersøgelse

Ovarier, uterus, cervix, vagina, testikler, bitestikler, sædblærer, prostata, accessoriske kønskirtler, hypofyse og målorgan(er) fra alle dyr i F₀- og F₁-generationerne præpareres om nødvendigt med henblik på mikroskopisk undersøgelse. Skulle det undtagelsesvist forekomme, at disse organer endnu ikke har været underkastet undersøgelse i andre forsøg med multipel dosering, undersøges de mikroskopisk hos dyrene i den gruppe, der har modtaget den højeste dosis og i kontrolgruppen i F₀-generationen og de F₁-dyr, der udvælges til parring samt hos de dyr, som er døde under forsøget, hvis det er praktisk muligt.

Hvis der konstateres abnormiteter i organer fra disse dyr, undersøges disse organer også hos alle andre dyr i de øvrige forsøgsgrupper. Der foretages i så fald mikroskopisk undersøgelse af alle væv, som udviser makroskopisk patologiske forandringer. Som anført i afsnittet parring kan reproduktionsorganerne fra de dyr, som formodes at være ufrugtbare, også underkastes mikroskopisk undersøgelse.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, antal drægtige dyr, typer af forandringer og den procentdel dyr, som udviser hver enkelt type forandring. Evaluering af resultaterne baseres så vidt muligt på en passende statistisk metode. Enhver anerkendt statistisk metode kan anvendes.

3. RAPPORTERING**3.1. Forsøgsrapport**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- anvendt dyreart/stamme
- oplysning om toksisk respons inddelt efter køn og dosis, herunder fertilitet, drægtighed og afkommets levedygtighed
- dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse til forsøgets afslutning
- tabel med angivelse af vægten af hvert enkelt kuld, ungenes gennemsnitlige vægt og hver enkelt unges vægt ved forsøgets afslutning
- toksisk eller anden virkning på reproduktion, afkom, postnatal vækst
- observationstidspunkt for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten
- data for foder- og legemsvægt for F_0 -generationen og de F_1 -dyr, der udvælges til parring
- obduktionsfund
- detaljeret beskrivelse af alle mikroskopiske fund, såfremt der foretages mikroskopisk undersøgelse
- eventuel statistisk behandling af resultaterne
- diskussion af resultaterne
- fortolkning af resultaterne.

3.2. Vurdering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B.

TOKSIKOKINETIK

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Teststoffet indgives på passende måde. Afhængigt af undersøgelsens formål kan teststoffet gives på en gang eller ad flere gange fordelt over fastlagte perioder, og der kan benyttes en eller flere grupper af forsøgsdyr. Afhængigt af undersøgelsens art foretages derefter bestemmelse af teststoffet og/eller dets metabolitter i kropsvæsker, væv og/eller excreta. Ved undersøgelsen kan anvendes både »mærket« og »umærket« teststof. Hvis der benyttes mærkning, skal denne være i en sådan position i teststoffet, at det giver flest muligt oplysninger om teststoffets omdannelse i organismen.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Sunde, unge, voksne dyr akklimatiseres til laboratoriets undersøgelsesbetingelser i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Forud for undersøgelsen randomiseres dyrene og fordeles i grupper. Under særlige omstændigheder kan der anvendes ganske unge, drægtige eller forbehandlede dyr.

*Forsøgsbetingelser**Forsøgsdyr*

Ved toksikokinetiske undersøgelser kan anvendes en eller flere egnede dyrearter, og der må tages hensyn til, hvilke dyrearter man har brugt eller har til hensigt at bruge i andre toksikologiske undersøgelser af det samme teststof. Hvis der anvendes gnavere, må dyrenes vægt ved undersøgelsens begyndelse ikke variere mere end $\pm 20\%$ af gennemsnitsvægten.

Antal og køn

Ved undersøgelse af optagelse og udskillelse anvendes fire dyr til hver dosis ved forsøgets begyndelse. Der stilles ikke krav vedrørende dyrenes køn — det kan dog under visse omstændigheder være nødvendigt at anvende begge køn. Hvis der er tale om kønsbetingede forskelle i teststoffets virkning, anvendes fire dyr af hvert køn. I forsøg med andre dyr end gnavere kan der benyttes et mindre antal dyr.

Ved undersøgelse af fordelingen i væv fastlægges den størrelse, forsøgsgrupperne skal have ved forsøgets begyndelse, under hensyntagen til både hvor mange dyr, der skal aflives på forud fastlagte tidspunkter, og hvor mange sådanne tidspunkter forsøget skal omfatte.

Ved undersøgelse af metabolismen fastlægges gruppestørrelsen efter behov.

Ved undersøgelse med flere doser og flere tidsafhængige delundersøgelser fastlægges gruppestørrelsen under hensyntagen til påregnet aflivning og antal undersøgelsestidspunkter, idet der dog ikke må anvendes mindre end to dyr pr. gruppe. Grupperne skal være tilstrækkeligt store til at muliggøre en acceptabel beskrivelse af absorption, koncentrationsniveauer og udskillelsesforhold for teststoffet og/eller dets metabolitter.

Dosisniveauer

Når teststoffet gives på en gang anvendes mindst to forskellige doser. Der anvendes en lav dosis, hvor der ikke observeres nogen toksisk effekt, og en høj dosis hvor der kan være tale om ændringer i de toksikokinetiske parametre eller om toksiske effekter.

Hvis teststoffet indgives gentagne gange, er det normalt tilstrækkeligt at anvende den lave dosis, men under visse omstændigheder kan det være nødvendigt også at anvende en høj dosis.

Administrationsmåde

Ved toksikokinetiske undersøgelser indgives teststoffet på samme måde og om muligt under anvendelse af samme vehikel som i allerede foretagne eller planlagte toksikologiske undersøgelser af samme teststof. Sædvanligvis indgives teststoffet enten oralt med mavesonde eller via foderet, ved påføring på huden eller ved inhalation i på forhånd fastlagte tidsrum. Intravenøs indgift kan være nyttig ved bestemmelse af den relative absorption ved andre administrationsmåder. Dertil kommer, at der kan tilvejebringes nyttige oplysninger om fordelingsmønstrer kort tid efter intravenøs indgift.

Der bør tages hensyn til muligheden for, at vehiklet interfererer med teststoffet. Samtidig må man være opmærksom på, at der kan være forskelle i absorptionen afhængigt af, om teststoffet indgives med mavesonde eller via foderet, og at der derfor er behov for en nøjagtig bestemmelse af størrelsen af dosis, især når teststoffet indgives via foderet.

Observationsperiode

Alle dyr observeres dagligt og toksicitetstegn og andre relevante kliniske symptomer registreres, idet det blandt andet registreres, hvornår de optræder første gang, hvor alvorlige de er, og hvor længe de varer.

Fremgangsmåde

Dyrene vejes, og teststoffet indgives under anvendelse af en passende administrationsform.

Absorption

Den mængde af det indgivne stof, der optages, og den hastighed, hvormed optagelsen foregår, kan vurderes ved hjælp af forskellige metoder med og uden referencegrupper ⁽¹⁾, f.eks.:

- bestemmelse af mængden af teststof og/eller metabolitter i excreta som urin, galde, fæces og udåndingsluft og den tilbageværende mængde i kroppen efter aflivning
- sammenligning af biologisk respons (f.eks. i undersøgelser af akut toksicitet) i forsøgs-, kontrol- og/eller referencegrupper
- sammenligning af mængden af teststof og/eller metabolitter, som udskilles gennem nyrerne i forsøgs- og referencegrupperne
- bestemmelse af arealet under kurven over plasmakoncentrationen af teststoffet og/eller dets metabolitter som funktion af tiden og sammenligning med data fra en referencegruppe.

⁽¹⁾ I den her beskrevne metode forstås ved referencegruppe en gruppe, som indgives teststoffet under anvendelse af en anden administrationsform, som sikrer, at hele dosis kan optages.

Fordeling

Der er i dag mulighed for at analysere fordelingsmønstrene på to måder, og man kan benytte den ene eller begge fremgangsmåder:

- der kan tilvejebringes nyttige kvalitative oplysninger ved anvendelse af helkropsautoradiografiske teknikker
- kvantitative oplysninger tilvejebringes ved aflivning af dyr på forskellige tidspunkter efter eksponeringen og fastlæggelse af mængden og koncentrationen af teststof og/eller metabolitter i væv og -organer.

Udskillelse

Ved undersøgelse af udskillelsen opsamles urin, fæces og udåndingsluft samt i visse tilfælde galde. Mængden af teststof og/eller metabolitter i disse excreta måles på flere tidspunkter efter eksponeringen, indtil ca. 95% af dosis er udskilt, dog højst i syv dage.

I specielle tilfælde kan det være nødvendigt at tage hensyn til udskillelse af teststof i mælken fra diegivende forsøgsdyr.

Metabolisme

Biologiske prøver analyseres under anvendelse af dertil egnede metoder med henblik på at bestemme metabolismens omfang og mønster. Hvor der er behov for at besvare spørgsmål som følge af tidligere toksikologiske undersøgelser, opklares metabolitternes struktur, og der fremsættes forslag til beskrivelse af sandsynlige metabolismeveje. Undersøgelser in vitro kan være en hjælp til fremskaffelse af oplysninger om metabolismens forløb.

Yderligere oplysninger om sammenhængen mellem metabolisme og toksisk effekt kan indhentes gennem biokemiske undersøgelser ved f.eks. at bestemme virkningen på metaboliserende enzymesystemer, reduktion i mængden af endogene non-protein sulfhydrylforbindelser og teststoffets binding til makromolekyler.

2. DATA

Data opstilles i tabelform og støttes, når det er muligt, af grafiske fremstillinger, alt afhængigt af undersøgelsestypen. Når det er muligt, anføres middelværdi og statistisk variation af alle målinger i relation til tid, doser, væv og organer for samtlige forsøgsgruppers vedkommende. Den absorberede og udskilte mængde samt udskilleleshastigheden bestemmes med dertil egnede metoder. Ved metabolismeundersøgelser oplyses de identificerede metabolitters struktur, og sandsynlige metabolismeveje fremlægges.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- dyreart, stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder
- beskrivelse af mærkede stoffer, når sådanne er anvendt
- dosisniveauer og anvendte intervaller
- administrationsmåde og eventuelle vehikler
- toksisk og anden virkning
- metoder til bestemmelse af teststof og/eller metabolitter i biologiske prøver, herunder udåndingsluft
- måleresultater opstillet i tabelform efter køn, doser, andre testparametre, tid, væv og organer

- den absorberede og udskilte mængde som en funktion af tiden
- metoder til karakterisering og identificering af metabolitter i biologiske prøver
- biokemiske målemetoder anvendt i forbindelse med metabolisme
- forslag til metabolismeveje
- diskussion af resultaterne
- fortolkning af resultaterne.

3.2. **Vurdering og fortolkning**

Se de generelle oplysninger til afsnit B.

4. **LITTERATURHENVISNINGER**

Se de generelle oplysninger til afsnit B.

MUTAGENICITETSTESTNING OG SCREENING FOR KARCINOGENICITET

GENMUTATION — SACCHAROMYCES CEREVISIAE

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

En række forskellige haploide og diploide stammer af gæren *Saccharomyces cerevisiae* kan anvendes ved undersøgelse af genmutationer, som induceres af kemiske stoffer med og uden metabolisk aktivering.

Man har anvendt fremadmutationssystemer med haploide stammer f.eks. ved bestemmelse af mutation fra røde, adeninafhængige mutanter (ade-1, ade-2) til dobbelt adeninafhængige hvide mutanter og selektive systemer som induktion af canavanin-resistens og cycloheximid-resistens.

Det bedst validerede tilbagemutationssystem bygger på anvendelse af den haploide stamme XV 185-14C, der er bærer af ochre nonsensemutationerne ade 2-1, arg 4-17, lys 1-1 og trp 5-48, og som muterer tilbage med baseparsubstitutionsmutagener, der inducerer punktmutationer eller ochre suppressormutationer. XV 185-14C er også bærer af his 1-7 markøren, som er en missense-mutation, der hovedsagelig muterer tilbage ved mutationer i andre loci, og markøren hom 3-10, der muterer tilbage med frameshift-mutagener.

Den eneste bredt anvendte diploide stamme af *S. cerevisiae* er *D₇*, der er homozygot i ilv 1-92.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Opløsninger af teststof og kontrol fremstilles umiddelbart inden testen under anvendelse af et passende vehikel. Hvis der anvendes organiske kemiske forbindelser, som er uopløselige i vand, kan organiske opløsningsmidler som ætanol, acetone eller dimetylsulfoxid (DMSO) bruges i koncentrationer på op til 2% v/v. Koncentrationen af vehiklet bør ikke medføre nogen ændring i cellevitalitet og vækstkaraktistika.

Metabolisk aktivering

Cellerne eksponeres for teststoffet både med og uden tilsætning af et passende eksogent metabolisk aktiverings-system.

Det hyppigst anvendte system består af en co-faktorberiget postmitochondrisk fraktion af lever fra gnavere, som er forbehandlet med enzyminducerende stoffer. Andre dyrearter, væv, post-mitochondriske fraktioner eller fremgangsmåder kan også være egnede til metabolisk aktivering.

Forsøgsbetingelser

Teststammer

Den haploide stamme XV 185-14C og den diploide stamme D₇ er de hyppigst anvendte i genmutationsundersøgelser. Også andre stammer kan være egnede.

Medier

Ved bestemmelse af overlevelsesgrad og antal mutanter anvendes passende kulturmedier.

Negative og positive kontroller

Sideløbende med testkulturerne dyrkes positive kontrolkulturer, ubehandlede kontrolkulturer og kontrolkulturer med det anvendte opløsningsmiddel. Der anvendes egnede positive kontrolstoffer for hvert enkelt genetisk endpoint.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes mindst fem forskellige koncentrationer af teststoffet med passende intervaller mellem koncentrationerne. Når der testes toksiske stoffer, bør den højeste koncentration ikke reducere overlevelsesgraden til mindre end 5 til 10 %. Stoffer, som er relativt uopløselige i vand, testes under anvendelse af passende fremgangsmåder op til opløselighedsgrænsen. Den højeste koncentration af ikke-toksiske teststoffer, som er frit opløselige i vand, fastlægges fra stof til stof.

Inkubationsbetingelser

Pladerne inkuberes i fire til syv dage mellem 28 og 30° C i mørke.

Spontane mutationsfrekvenser

Der anvendes subkulturer med spontane mutationsfrekvenser, som ligger inden for de almindeligt accepterede områder.

Antal parallelle plader

Der anvendes mindst tre parallelle plader for hver koncentration ved bestemmelsen af prototrofer, som er fremkommet ved genmutation, og af cellernes levedygtighed. Når man tester markører, der som hom 3-10 har en lav mutationsfrekvens, må antallet af plader forøges, således at der kan tilvejebringes en statistisk relevant mængde data.

Fremgangsmåde

Stammer af *S.cerevisiae* eksponeres normalt ved test i væske, hvortil der anvendes enten celler i stationærfase eller celler i vækstfase. Indledende undersøgelser bør udføres med celler i vækstfase. $1-5 \times 10^7$ celler pr. ml eksponeres for teststoffet i op til 18 timer ved 28 til 37° C under omrystning. Hvis det er nødvendigt, tilsættes en passende mængde metabolisk aktiveringssystem under eksponeringen. Efter eksponeringen centrifugeres og vaskes cellerne, hvorefter de udsås på et egnet kulturmedium. Når inkubationen er slut, registreres induktionen af genmutationer og antal overlevende på hver plade. Hvis den første undersøgelse er negativ, bør en anden udføres under anvendelse af celler i stationærfase. Hvis den første undersøgelse er positiv, skal det efterprøves i et passende uafhængigt forsøg.

2.

DATA

Data opstilles i tabelform. Antal optalte kolonier, antal mutanter, overlevelsesfrekvens samt mutationsfrekvens angives. Alle resultater efterprøves i et uafhængigt forsøg. Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- den anvendte stamme
- forsøgsbetingelser: celler i stationær fase eller vækstfase, mediernes sammensætning, inkubationstemperatur og -periode, metabolisk aktiveringssystem
- eksponeringsbetingelser: eksponeringskoncentrationer, fremgangsmåde og varighed, eksponeringstemperatur, positive og negative kontroller
- antal optalte kolonier, antal mutanter, overlevelsesh- og mutationsfrekvens, om muligt dosis-responsforhold, statistisk evaluering af data
- diskussion af resultaterne
- fortolkning af resultaterne.

3.2. Evaluering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. REFERENCER

Se den generelle indledning til afsnit B.

MITOTISK REKOMBINATION — SACCHAROMYCES CEREVISIAE

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Der kan hos *Saccharomyces cerevisiae* konstateres mitotisk rekombination mellem gener (eller mere generelt mellem et gen og dets centromer) og inden for det samme gen. Den førstnævnte form kaldes mitotisk overkrydsning og frembringer reciproke typer, mens den sidstnævnte som oftest ikke er reciprok og kaldes genbytning. Overkrydsning bestemmes almindeligvis ved frembringelse af recessive homozygote kolonier eller sektorer i en heterozygot stamme, mens genbytning bestemmes ved frembringelse af prototrofe revertanter i en auxotrof heteroallel stamme, som bærer to forskellige, defekte alleler af det samme gen. De hyppigst anvendte stammer ved undersøgelse af mitotisk genbytning er D_4 (med heteroallele *ade 2* og *trp 5*), BZ_{34} (med heteroallel *arg 4*), D_7 (med heteroallel *trp 5*) og JD_1 (med heteroallele *his 4* og *trp 5*). Mitotisk overkrydsning, som frembringer røde og lyserøde sektorer, kan undersøges i D_5 og D_7 (der også kan bruges til bestemmelse af mitotisk genbytning og tilbage mutation af *ilv 1-92*), idet begge stammer bærer heteroallele komplementære alleler til *ade 2*.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Opløsninger af teststof og kontrol- eller referencestoffer fremstilles umiddelbart inden testen under anvendelse af et passende opløsningsmiddel. Hvis der anvendes organiske kemiske forbindelser, som er uopløselige i vand, kan organiske opløsningsmidler som ætanol, acetone eller dimetylsulfoxid (DMSO) bruges i koncentrationer på op til 2% v/v. Koncentrationen af vehiklet bør ikke medføre nogen ændring i celle vitalitet og vækst karakteristika.

Metabolisk aktivering

Cellerne eksponeres for teststof både med og uden tilsætning af et passende eksogent metabolisk aktiverings-system.

Det hyppigst anvendte system består af en co-faktorberiget postmitochondrisk fraktion af lever fra gnavere, som er forbehandlede med enzyminducerende stoffer. Andre dyrearter, væv, postmitochondriske fraktioner eller fremgangsmåder kan også være egnede til metabolisk aktivering.

*Forsøgsbetingelser**Teststammer*

De hyppigst anvendte stammer er de diploide D_4 , D_5 , D_7 og JD_1 . Også andre stammer kan være egnede.

Medier

Ved bestemmelse af overlevelsesgrad og mitotisk rekombinationsfrekvens anvendes passende kulturmedier.

Negative og positive kontroller

Sideløbende med testkulturerne dyrkes positive kontrolkulturer, ubehandlede kontrolkulturer og kontrolkulturer med det anvendte opløsningsmiddel. Der anvendes egnede positive kontrolstoffer for hvert enkelt genetisk endpoint.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes mindst fem forskellige koncentrationer af teststoffet med passende intervaller mellem koncentrationerne. Herunder må man tage hensyn til faktorer som cytotoxicitet og opløselighed. De laveste koncentrationer bør ikke have nogen indvirkning på cellernes levedygtighed. Når der testes toksiske stoffer, bør den højeste koncentration ikke reducere overlevelsesgraden til mindre end 5 til 10%. Stoffer, som er relativt uopløselige i vand, testes under anvendelse af passende fremgangsmåder op til opløselighedsgrænsen. Den højeste koncentration af ikke-toxiske teststoffer, som er frit opløselige i vand, fastlægges fra test til test.

Celler i stationær fase eller vækstfase kan eksponeres for teststoffet i op til 18 timer. Benyttes der lange eksponeringsperioder, bør kulturerne dog undersøges mikroskopisk for sporedannelse, idet disses tilstedeværelse gør testen værdiløs.

Inkubationsbetingelser

Pladerne inkuberes i fire til syv dage mellem 28 og 30° C i mørke. Plader, som anvendes til bestemmelse af røde og lyserøde homozygote sektorer, der er frembragt ved mitotisk overkrydsning, opbevares i køleskab (omkring 4° C) i yderligere en til to dage inden optælling for at muliggøre udvikling af de rette pigmenterede kolonier.

Spontane mitotiske rekombinationsfrekvenser

Der anvendes subkulturer med spontane mitotiske frekvenser, som ligger inden for de almindeligt accepterede områder.

Antal parallelle plader

Der anvendes mindst tre parallelle plader for hver koncentration ved bestemmelsen af prototrofer, som er fremkommet ved mitotisk genbytnings, og af cellernes levedygtighed. Når man tester recessive homozygoter, som er frembragt ved mitotisk overkrydsning, forøges antallet af plader, således at der opnås et passende antal kolonier.

Fremgangsmåde

Stammer af *S. cerevisiae* eksponeres normalt ved test i væske, hvortil der anvendes enten celler i stationær fase eller celler i vækstfase. Indledende undersøgelser bør udføres med celler i vækstfase. $1-5 \times 10^7$ celler pr. ml eksponeres for teststoffet i op til 18 timer ved 28 til 37° C under omrystning. Under eksponeringen tilsættes en passende mængde metabolisk aktiveringssystem. Efter eksponeringen centrifugeres og vaskes cellerne, hvorefter de udsås på et egnet kulturmedium. Når inkubationen er slut, registreres induktionen af mitotisk rekombination og antal overlevende på hver plade. Hvis den første undersøgelse er negativ, bør en anden udføres under anvendelse af celler i stationær fase. Hvis den første undersøgelse er positiv, skal det efterprøves i et passende uafhængigt forsøg.

2.

DATA

Data opstilles i tabelform. Antal optalte kolonier, antal rekombinanter, overlevelsesgrad samt rekombinationsfrekvens angives. Alle resultater efterprøves i et uafhængigt forsøg. Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING**3.1. Forsøgsrapport**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- den anvendte stamme
- forsøgsbetingelser: celler i stationær fase eller vækstfase, mediernes sammensætning, inkubationstemperatur og -periode, metabolisk aktiveringssystem
- eksponeringsbetingelser: eksponeringskoncentrationer, fremgangsmåde og varighed, eksponeringstemperatur, positive og negative kontroller
- antal optalte kolonier, antal rekombinanter, overlevelseshastighed og rekombinationsfrekvens, om muligt dosis-responsforhold, statistisk evaluering af data
- diskussion af resultaterne
- fortolkning af resultaterne.

3.2. Evaluering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. REFERENCER

Se den generelle indledning til afsnit B.

GENMUTATIONSTEST — PATTEDYRCELLER IN VITRO

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Cellekulturer fra pattedyr kan anvendes ved påvisning af mutationer, som induceres af kemiske stoffer. Hyppigt anvendes muselymfomceller L 5178 Y samt CHO og V-79 cellelinjerne fra kinesiske hamstre. Almindeligvis benyttes disse cellelinjer til bestemmelse af mutationer i følgende loci: thymidin-kinase (TK), hypoxantinguandin-fosforibosyl-transferase (HPRT) ⁽¹⁾ og Na⁺/K⁺ ATPase. I TK- og HPRT-mutationssystemerne påvises baseparsubstitution, frameshift-mutationer og mindre tabsmutationer. I Na⁺/K⁺-systemet påvises kun baseparsubstitution.

Celler, som mangler thymidin-kinase (TK) på grund af fremadmutationen TK⁺ → TK⁻, er resistente over for bromdeoxyuridin (BrDU), fluordeoxyuridin (FdU) eller trifluorthymidin (TFT), idet disse antimetabolitter ikke kan inkorporeres i cellens nukleotider. De nukleotider, der er nødvendige for cellens stofskifte, syntetiseres udelukkende de novo. Hvis cellerne har funktionsdygtig thymidin-kinase inkorporeres BrdU, FdU eller TFT imidlertid i nukleotiderne. Derved hæmmes cellernes stofskifte, og der opstår en cytotoxisk effekt. Muterede celler kan således fortsat dele sig i et miljø, som indeholder BrdU, FdU eller TFT, hvilket normale celler, som indeholder thymidin-kinase, ikke kan.

På samme måde er celler, som mangler HPRT, resistente over for 8-azaguanin (AG), eller 6-thioguanin (TG). Celler med ændret Na⁺/K⁺ ATPase er resistente over for ouabain.

Den cytotoxiske effekt bestemmes på grundlag af teststoffets virkning på dannelsen af kolonier (klondannelseseffektiviteten) eller kulturernes vækstrate. Mutationsfrekvensen bestemmes ved udsåning af et kendt antal celler i medium tilsat et selektivt stof, hvorefter antallet af muterede celler registreres. Ved udsåning i medium uden selektivt stof bestemmes overlevelsesfrekvensen. Efter en passende inkubationsperiode tælles kolonierne. Mutationsfrekvensen beregnes på grundlag af antallet af muterede kolonier korigeret på grundlag af overlevelsesgraden.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

*Forberedelser***Celler**

En lang række cellelinjer lader sig anvende i denne test, herunder subkloner af L 5178 Y, CHO eller V-79 celler, hvis følsomhed over for kemiske mutagener er påvist, hvis klondannelseseffektivitet er høj, og hvis spontane mutationsfrekvens er lav. Der kan foretages regelmæssig efterprøvning af cellekaryotypens stabilitet, og det bør undersøges, om cellerne er kontamineret med mycoplasma. Også andre celletyper kan anvendes, forudsat deres validitet til bestemmelse af kemisk inducerede genmutationer lader sig dokumentere.

⁽¹⁾ Tidligere kaldet HGPRT.

Medium

Der anvendes egnede cellekulturmedier og inkubationsbetingelser (f.eks. temperatur, kulturskåle, CO₂-koncentration og fugtighed). Medier og sera vælges i overensstemmelse med, hvilke selektive systemer og celletyper, der anvendes.

Teststof

Teststoffer tilsættes kulturmediet eller opløses eller suspenderes i egnede vehikler, inden cellerne eksponeres. Den derved opnåede koncentration af bærestof i testkulturen bør ikke påvirke cellernes levedygtighed eller vækstrate.

Metabolisk aktivering

Cellerne eksponeres for teststoffet både med og uden et eksogent metabolisk aktiveringssystem fra pattedyr. Hvis der benyttes celletyper med endogen metabolisk aktivering bør det være påvist, at aktiveringsform og -hastighed er egnet til den kemiske stofklasse, der testes.

Forsøgsbetingelser

Negative og positive kontroller

Som positiv kontrol anvendes i hvert enkelt forsøg både en direkte virkende kemisk forbindelse og en forbindelse, som kræver metabolisk aktivering. Desuden foretages negativ (vehikel) kontrol. Følgende kemiske forbindelser kan f.eks. anvendes til positiv kontrol:

- direkte virkende forbindelser:
 - ætylmetansulfonat
 - hycantone
- indirekte virkende forbindelser:
 - 2-acetylaminofluoren
 - 7, 12-dimetylbenzanthracen
 - N-nitrosodimetylamin.

Når det er muligt bør der foretages supplerende positiv kontrol med anvendelse af en kemisk forbindelse af samme type som teststoffet.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes en række forskellige koncentrationer af teststoffet, således at der frembringes koncentrationsafhængige toksiske virkninger. Den højeste koncentration bør medføre en lav overlevelseshastighed, og overlevelseshastigheden ved den laveste koncentration bør være af samme størrelsesorden som ved det negative kontrolforsøg. Stoffer, som er relativt uopløselige i vand, testes under anvendelse af passende fremgangsmåder op til opløselighedsgrænsen. Den højeste koncentration af ikke toksiske teststoffer, som er frit opløselige i vand, fastlægges fra test til test.

Fremgangsmåde

Antallet af anvendte celler pr. kultur fastlægges under hensyntagen til den spontane mutationsfrekvens. Som generel regel kan sættes et antal levedygtige celler svarende til ti gange den omvendte proportionale værdi af den spontane mutationsfrekvens.

Cellerne eksponeres i en passende periode — i de fleste tilfælde er to til fem timer tilstrækkeligt. Celler, hvis endogene metaboliske aktivering er utilstrækkelig, testes både med og uden et passende metabolisk aktiveringssystem. Efter eksponeringen vaskes cellerne frie for teststof, hvorefter de dyrkes med henblik på bestemmelse af deres levedygtighed og med henblik på at lade den muterede fænotype komme til udtryk.

Dyrkningsperioden bør være tilstrækkeligt lang til, at de inducerede mutationer så vidt muligt kan nå at komme til optimalt fænotypisk udtryk, og herefter dyrkes cellerne i medier med og uden selektive agenser med henblik på at bestemme antal mutanter og levedygtighed.

Alle resultater efterprøves i et uafhængigt forsøg.

2. DATA

Data opstilles i tabelform. Antal inducerede mutanter og overlevende angives for hver enkelt plade, både teststof- og kontrolplader. Desuden angives det gennemsnitlige antal kolonier pr. plade og standardafvigelsen. Mutationsfrekvensen beregnes som antal mutanter divideret med antal overlevende celler. Overlevelsesheden og kloningseffektiviteten beregnes som en procentdel af kontrolkulturen. Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING**3.1. Forsøgsrapport**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- den anvendte cellelinje, antal cellekulturer, metoder til opretholdelse af cellekulturer
- forsøgsbetingelser: mediernes sammensætning, CO₂-koncentration, teststofkoncentration, anvendt vehikel, inkubationstemperatur og -periode, dyrkningsperiode med henblik på fænotypisk udtryk (herunder antal udsåede celler og eventuelle subkulturer med medietilsætninger), eksponeringsperiode, celletæthed under eksponeringen, anvendt metabolisk aktiveringssystem fra pattedyr, positiv og negativ kontroller, anvendt selektiv agens
- begrundelse for valget af doser
- metoder til optælling af levedygtige og muterede celler
- statistisk evaluering
- diskussion af resultaterne
- fortolkning af resultaterne.

3.2. Evaluering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. REFERENCER

Se den generelle indledning til afsnit B.

DNA-SKADE OG DNA-REPARATION — UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS — PATTEDYRCELLER IN VITRO

1. METODE**1.1. Indledning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Ved Unscheduled DNA Synthesis (UDS) test undersøges DNA-reparationen efter bortskæring og fjernelse af skader, som er induceret af kemiske eller fysiske agentia. Testen bygger på inkorporering af tritiummærket thymidin ($^3\text{H-TdR}$) i pattedyrcellers DNA, når disse celler ikke er i S-fase. Optagelsen af $^3\text{H-TdR}$ kan måles ved autoradiografi eller væskescintillationstælling (LSC) af DNA fra de eksponerede celler. Medmindre der anvendes primærkulturer af rottehepatocytter, eksponeres dyrkede pattedyrceller for teststoffet med og uden et eksogen metabolisk aktiveringssystem. UDS-test kan også foretages i in vivo-systemer.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden*Forberedelser*

Teststof samt kontrol- og referencestoffer tilsættes kulturmediet eller opløses eller suspenderes i egnede vehikler og tilsættes derefter kulturmediet inden testen. Den derved opnåede vehikkelkoncentration bør ikke påvirke cellernes levedygtighed. Der kan anvendes primærkulturer af rottehepatocytter, humane lymfocytter eller etablerede cellelinjer (f.eks. humane diploide fibroblaster).

Cellerne eksponeres for teststoffet med og uden et passende metabolisk aktiveringssystem.

*Forsøgsbetingelser***Antal kulturer**

Ved autoradiografisk påvisning af UDS anvendes mindst to og ved LSC seks kulturer (eller mindre hvis det er videnskabeligt begrundet) for hvert eksperimentelt punkt.

Negative og positive kontroller

Der foretages sideløbende både positiv og negativ (ubehandlet og/eller vehikel) kontrol med og uden metabolisk aktivering i hvert forsøg.

Som positiv kontrol ved anvendelse af rottehepatocytter kan f.eks. benyttes 7,12-DMBA (7,12-dimetylbenzanthracen) eller 2-AAF (2-acetylaminofluoren). Som positiv kontrol ved anvendelse af etablerede cellelinjer kan f.eks. benyttes 4-NQO (4-nitroquinolin-N-oxid) både i forbindelse med autoradiografisk registrering og LSC uden metabolisk aktivering. Når der anvendes metaboliske aktiveringssystemer kan f.eks. N-dimetylnitrosamin benyttes til positiv kontrol.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes en række forskellige koncentrationer af teststoffet over et interval, som dækker alle påvirkninger. Den højeste koncentration bør have en vis cytotoxisk virkning. Stoffer, som er relativt uopløselige i vand, testes op til opløselighedsgrænsen.

Den højeste koncentration af ikke-toksiske teststoffer, som er frit opløselige i vand, fastlægges fra test til test.

Celler

Der benyttes passende vækstmedier, CO₂-koncentration, temperatur og fugtighed til opretholdelse af kulturerne. Det undersøges regelmæssigt om etablerede cellelinjer er kontamineret med mycoplasma.

Metabolisk aktivering

Der anvendes ikke metaboliske aktiveringssystemer i forbindelse med primærkulturer af hepatocytter.

Etablerede cellelinjer og lymfocytter eksponeres for teststoffer både med og uden et passende metabolisk aktiveringssystem.

Fremgangsmåde

Forberedelse af kulturer

Etablerede cellelinjer fremstilles på basis af stamkulturer (f.eks. ved trypsinering eller afrytning) og udsås med passende tæthed i dyrkningskåle, hvorefter de inkuberes ved 37° C.

Primære rottehepatocyttekulturer etableres, når hepatocytter umiddelbart efter isolering anbringes i et passende medium og får lov til at hæfte sig til den voksende overflade.

Humane lymfocyttekulturer dyrkes under anvendelse af dertil egnede teknikker.

Eksponering af kulturerne for teststoffet

Primærkulturer af rottehepatocytter

Rottehepatocytter eksponeres for teststoffet kort tid efter isolering i et passende tidsrum i et medium, som indeholder ³H-TdR. Efter eksponeringen fjernes cellerne fra mediet, hvorefter de vaskes, fikseres og tørres.

Pladerne dyppes i en autoradiografisk emulsion (alternativt kan »stripping« film anvendes) og eksponeres, fremkaldes, farves og tælles.

Etablerede cellelinjer og lymfocytter

Autoradiografisk teknik: Cellekulturerne eksponeres først for teststoffet i et passende tidsrum og derefter for ³H-TdR. Eksponeringsperioderne afhænger af stofferne, de metaboliske aktiveringssystemer og celletyperne. Eksponeringen for ³H-TdR bør enten foregå samtidig med eksponeringen for teststoffet eller få minutter efter, således at UDS måles på det tidspunkt, hvor aktiviteten er størst.

Valget mellem de to fremgangsmåder afhænger af risikoen for interaktion mellem teststoffet og ³H-TdR.

Det er muligt at skelne mellem UDS og semi-konservativ DNA replication, idet den sidstnævnte proces inhiberes ved anvendelse af f.eks. argininfattige medier, et lavt serumindhold eller tilsætning af hydroxyurinostof til kulturmediet.

LSC-måling af UDS: Inden eksponering for teststoffet blokeres cellernes overgang til S-fasen som tidligere beskrevet. Derefter eksponeres cellerne på samme måde som ved den autoradiografiske teknik. Umiddelbart efter inkubationen ekstraheres cellernes DNA og det totale DNA-indhold samt mængden af inkorporeret ³H-TdR måles.

Når de nævnte teknikker anvendes på humane lymfocytter, er det unødvendigt at hæmme den semi-konservative DNA replication, med mindre der er tale om stimulerede kulturer.

Analyse

Autoradiografisk måling

Ved måling af UDS i dyrkede celler medregnes kerner i S-fasen ikke. Der tælles mindst 50 celler pr. koncentration. Objektglassene kodes før tællingen. På hvert glas tælles en række forskellige tilfældigt valgte områder med stor indbyrdes afstand. Mængden af inkorporeret $^3\text{H-TdR}$ i cytoplasmaet bestemmes ved tælling i tre områder på størrelse med kernen i hver optalt celledes cytoplasma.

LSC-måling

Ved LSC-måling af UDS anvendes et passende antal kulturer pr. koncentration og pr. kontrolforsøg. Alle resultater efterprøves i et uafhængigt forsøg.

2. DATA

Data opstilles i tabelform.

2.1. Autoradiografisk måling

Mængden af inkorporeret $^3\text{H-TdR}$ i cytoplasmaet og antallet af korn, som registreres i cellekerneområdet, anføres separat. Fordelingen af mængden af inkorporeret $^3\text{H-TdR}$ i cytoplasmaet og antallet af korn pr. kerne kan beskrives ved hjælp af middel, median og modus.

2.2. LSC-måling

Ved LSC-måling angives $^3\text{H-TdR}$ indlejringen som dpm/ μg DNA. Indlejringsfordelingen kan beskrives ved hjælp af middel dpm/ μg DNA med tilhørende standardafvigelse. Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- de anvendte celler, tæthed og antal passager på eksponeringstidspunktet, antal cellekulturer
- metoder til opretholdelse af cellekulturer, herunder medium, temperatur og CO_2 -koncentration
- teststof, vehikel, koncentrationer og begrundelse for valget af de anvendte koncentrationer
- detaljerede oplysninger om de metaboliske aktiveringssystemer
- eksponeringsplan
- positiv og negativ kontrol

- den anvendte autoradiografiske teknik
- fremgangsmåde ved blokering af cellernes overgang til S-fasen
- fremgangsmåde ved ekstraktion af DNA og bestemmelse af det totale DNA-indhold ved LSC-målingen
- om muligt dosis-responsforhold
- statistisk evaluering
- diskussion af resultaterne
- fortolkning af resultaterne.

3.2. **Evaluering og fortolkning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. **REFERENCER**

Se den generelle indledning til afsnit B.

SØSTERKROMATID OMBYTNING (SCE) IN VITRO

1. METODE**1.1. Indledning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Søsterkromatid ombytning (SCE) test er en korttidstest, som anvendes til påvisning af reciprok udveksling af DNA mellem de to søsterkromatider i et kromosom under replikation. Ved SCE sker der en udveksling af DNA replikationsprodukter ved tilsyneladende homologe loci. Udvekslingsprocessen bygger antageligt på brud og genforening af DNA-kæder, men dens molekylære grundlag er næsten ukendt. For at kunne påvise SCE er det nødvendigt at differentialmærke søsterkromatiderne, hvilket kan gøres ved at inkorporere bromdeoxyuridin (BrdU) i kromosomernes DNA gennem to celleykler.

Pattedyrceller eksponeres in vitro for teststoffet med og uden et eksogent metabolisk aktiveringssystem fra pattedyr, hvis dette skønnes relevant, og dyrkes gennem to celleykler i et medium, som indholder BrdU. Cellerne behandles med en tetrådsinhibitor (f.eks. colchicin) med henblik på at akkumulere celler på et metafaselignende trin i mitosen (c-metafase), hvorefter de høstes og præpareres til kromosomanalyse.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden*Forberedelser*

- Der kan anvendes primærkulturer (humane lymfocytter) eller etablerede cellelinjer (f.eks. Chinese Hamster Ovary celler). Ved anvendelse af cellelinjer bør det undersøges, om kulturen er kontamineret med mycoplasma.
- Der anvendes egnede kulturmedier og inkubationsbetingelser (temperatur, dyrkningsskåle, CO₂-koncentration og fugtighed).
- Teststoffet tilsættes kulturmediet eller opløses eller suspenderes i et egnet vehikel, inden cellerne eksponeres. Den derved opnåede koncentration af vehikel i testkulturen bør ikke påvirke cellernes levedygtighed eller vækstrate og en mulig påvirkning af SCE-frekvensen kontrolleres ved dyrkning af en kontrolkultur i opløsningsmidlet.
- Cellerne eksponeres for teststoffet både med og uden et eksogent metabolisk aktiveringssystem fra pattedyr. Når der benyttes celletyper med endogen metabolisk aktivering, bør aktiveringsform og -hastighed være egnet til den kemiske stofklasse, der testes.

*Forsøgsbetingelser***Antal kulturer**

Der anvendes mindst to parallelle kulturer for hvert eksperimentelt punkt.

Positiv og negativ kontrol

Som positiv kontrol anvendes i hvert enkelt forsøg både en direkte virkende kemisk forbindelse og en forbindelse, som kræver metabolisk aktivering. Desuden foretages vehikkelkontrol.

Følgende kemiske forbindelser kan f.eks. anvendes til positiv kontrol:

- direkte virkende forbindelse: ætylmetansulfonat
- indirekte virkende forbindelse: cyclofosamid.

Når det skønnes relevant, bør der foretages supplerende positiv kontrol med anvendelse af en kemisk forbindelse af samme kemiske stofklasse som teststoffet.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes mindst tre koncentrationer af teststoffet med passende intervaller mellem koncentrationerne. Den højeste koncentration bør have en tydelig toksisk virkning, men den må ikke forhindre den nødvendige celledeling. Stoffer, som er relativt uopløselige i vand, testes under anvendelse af passende fremgangsmåder op til opløselighedsgrænsen. Den højeste koncentration af ikke-toksiske teststoffer, som er frit opløselige i vand, fastlægges fra test til test.

Fremgangsmåde

Dyrkning

Cellelinjer etableres på basis af stamkulturer (f.eks. ved trypsinering eller afrystning) og udsås med passende tæthed i dyrkningsskåle, hvorefter de inkuberes ved 37° C. Når der er tale om monolagskulturer, justeres antallet af celler pr. kulturskål, således at kulturerne på høsttidspunktet højst dækker 50 % af vækstarealet. Cellerne kan også dyrkes i suspension. Humane lymfocyt-kulturer dyrkes under anvendelse af dertil egnede teknikker på basis af hepariniseret blod og inkuberes ved 37° C.

Eksposering

Celler i eksponentiel vækstfase eksponeres for teststoffet i et passende tidsrum. Som oftest vil en eller to timer være tilstrækkeligt, men i nogle tilfælde kan eksponeringsperioden udvides til at dække to fulde cellecykler. Celler, hvis endogene metaboliske aktivering er utilstrækkelig, eksponeres både med og uden tilsætning af et passende metabolisk aktiveringssystem. Efter eksponeringen vaskes cellerne frie for teststof og dyrkes gennem to cellecykler i et medium, som indeholder BrdU. Alternativt kan cellerne eksponeres for teststoffet og BrdU samtidigt gennem en periode svarende til to cellecykler. Humane lymfocytter eksponeres, mens de befinder sig i semisynkron tilstand. Cellerne analyseres under deres anden deling efter eksponeringen, hvilket sikrer, at eksponeringsperioden dækker størstedelen af de følsomme faser i cellecyklus. Alle kulturer, som er tilsat BrdU, opbevares og manipuleres i mørke eller svagt lys fra glødelamper frem til cellerne høstes for at minimere fotolysen af DNA, som indeholder BrdU.

Høst af celler

Cellekulturerne behandles med en tetrådsinhibitor (f.eks. colchicin) en til fire timer, før de høstes. Høst og kromosompræparering foregår særskilt for hver enkelt kultur.

Kromosompræparering og farvning

Ved kromosompræpareringen anvendes cytogenetiske standardteknikker. Farvning på objektglas med henblik på at påvise SCE kan foretages på en række forskellige måder (f.eks. fluorescens plus Giemsa-farvning).

Analyse

Antallet af celler, som underkastes analyse, baseres på den spontane SCE-frekvens i kontrolforsøg. Normalt undersøges mindst 25 velpræparerede metafaser pr. kultur for SCE. Objektglassene kodes før analysen.

Ved analyse af humane lymfocytter medtages kun metafaser med 46 centromerer. Ved analyse af etablerede cellelinjer medtages kun metafaser med det modale antal centromerer ± 2 . Det anføres, hvorvidt ombytning i mærkningen omkring centromeret betragtes som SCE. Resultaterne efterprøves i et uafhængigt forsøg.

2. DATA

Data opstilles i tabelform. Antal SCE pr. metafase og antal SCE pr. kromosom anføres separat for alle eksponerede kulturer og kontrolkulturer. Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- de anvendte celler, metoder til opretholdelse af cellekulturer
- forsøgsbetingelser: mediernes sammensætning, CO₂-koncentration, teststofkoncentration, det anvendte vehikel, inkubationstemperatur, eksponeringsperiode, den anvendte tetrådsinhibitor plus oplysninger om koncentration og behandlingens varighed, det anvendte metaboliske aktiveringssystem, positiv og negativ kontrol
- antal cellekulturer pr. eksperimentelt punkt
- detaljerede oplysninger om objektpræpareringsteknikken
- antal analyserede metafaser (separate oplysninger for hver enkelt kultur)
- gennemsnitligt antal SCE pr. celle og pr. kromosom (data angives separat for hver kultur)
- SCE-registreringskriterier
- begrundelse for valget af doser
- om muligt dosis-responsforhold
- statistisk evaluering
- diskussion af resultaterne
- fortolkning af resultaterne.

3.2. Evaluering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. REFERENCER

Se den generelle indledning til afsnit B.

KØNSBUNDET RECESSIV LETAL TEST — DROSOPHILA MELANOGASTER

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Ved kønsbundet recessiv letal test (SLRL) under anvendelse af *Drosophila melanogaster* undersøges forekomsten af både punktmutationer og mindre tabsmutationer hos insektets afkom. Der er tale om en fremadmutationstest, hvorved det er muligt at screene ca. 800 loci på X-kromosomet med henblik på registrering af mutationer. Dette antal udgør ca. 80 % af alle X-kromosomets loci. X-kromosomet udgør omkring en femtedel af den samlede haploide kromosommængde.

Mutationer i *Drosophila melanogaster*'s X-kromosom kommer fænotypisk til udtryk hos hanner, som er bærere af det muterede gen. Når mutationen under hemizygot betingelser er letal, konstateres dette som fravær af en af de to typer hanner, der normalt findes i en heterozygot huns afkom. I SLRL-testen udnyttes dette forhold ved hjælp af specielt arrangerede kromosomer med særlige markører.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

*Forberedelser**Stammer*

Der kan anvendes hanner af veldefinerede vildtypestammer og hunner fra Muller-5-stammen. Hunner fra andre stammer med passende mærkning og multipelt inverterede X-kromosomer kan også anvendes.

Teststof

Teststoffet opløses i vand. Stoffer, som er uopløselige i vand, kan opløses eller suspenderes i egnede bærestoffer (f.eks. en blanding af ætanol og Tween-60 eller -80) og derefter fortyndes i vand eller saltvand inden indgift. Dimetylsulfoxid bør ikke benyttes som bærestof.

Antal

Testen udformes således, at testfølsomhed og -specificitet er fastlagt på forhånd. Den spontane mutationsfrekvens, som registreres i kontrollforsøg, vil være af stor betydning for antallet af eksponerede kromosomer, der skal analyseres.

Administrationsmåde

Eksponeringen kan foregå ved oral indgivelse, injektion eller ved udsættelse for gasser eller dampe. Teststoffet kan eventuelt indgives i en sukkeropløsning. Om nødvendigt kan det opløses i en 0,7 % NaCl-opløsning og injiceres i thorax eller abdomen.

Negative og positive kontroller

Der foretages negativ (vehikel) og positiv kontrol. Hvis der foreligger egnede historiske kontrolldata fra laboratorieforsøg, er det imidlertid ikke nødvendigt at foretage sideløbende kontrol.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes tre eksponeringskoncentrationer. Til en foreløbig vurdering kan anvendes en enkelt koncentration, som enten kan være den højeste koncentration, insekterne kan tåle, eller en koncentration, som forårsager nogen grad af toksisk virkning. Ved ikke-toksiske stoffer eksperimenteres for de størst mulige koncentrationer.

Fremgangsmåde

Vildtypehanner (tre til fem dage gamle) eksperimenteres for teststoffet og parres enkeltvis med flere jomfruelige hunner fra Muller-5-stammen eller fra andre stammer med passende markører (multipelt inverterede X-kromosomer). Hunnerne udskiftes med nye jomfruelige hunner hver anden eller hver tredje dag, indtil hele kønscyklusen er dækket. Hunnerens afkom registreres med henblik på konstatering af letale effekter, som svarer til eksponeringsvirkning på henholdsvis modne sædceller, spermatider i sene stadier eller middelstadier, spermatider i tidlige stadier, spermatocytter og spermatogonier. Heterozygote F_1 -hunner fra de ovennævnte krydsninger parres individuelt (dvs. en hun pr. glas) med deres brødre. I F_2 -generationen registreres hver bestand med henblik på konstatering af fravær af vildtypehanner. Hvis en bestand er afkom af en F_1 -hun, som synes at bære et letalt gen i det parentale X-kromosom (dvs. der optræder ingen hanner med det eksponerede kromosom), testes døtre af denne hun med samme genotype med henblik på konstatering af, om den letale effekt gælder i næste generation.

2. DATA

Data opstilles i tabelform. Antal testede X-kromosomer, antal ufrugtbare hanner og antal letale kromosomer anføres for hver eksponeringskoncentration og for hver enkelt af de eksponerede hanners parringsperioder. Ligeledes anføres antal klynger af forskellig størrelse pr. han. Alle resultater efterprøves i et uafhængigt forsøg.

Evalueringen af kønsbunden recessiv letal test baseres på passende statistiske metoder. I tilfælde af ophobning af generationer med recessive letale gener, som stammer fra en enkelt han, registreres disse og evalueres på et passende statistisk grundlag.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- stammer: de anvendte *Drosophila*-stammer, insekternes alder, antal eksponerede hanner, antal sterile hanner, antal etablerede F_2 -bestande, antal F_2 -bestande uden afkom, antal kromosomer med letale gener på hvert kønscellestadium
- kriterier for fastlæggelse af størrelsen af de eksponerede grupper
- forsøgsbetingelser: detaljeret beskrivelse af eksponerings- og stikprøvetagningsplan, eksponeringskoncentrationer, toksicitetsdata, negativ (opløsningsmiddel) og positiv kontrol, såfremt der foretages kontrol
- kriterier for registrering af letale mutationer
- om muligt dosis-responsforhold
- statistisk evaluering
- diskussion af resultaterne
- fortolkning af resultaterne.

3.2. Evaluering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. REFERENCER

Se den generelle indledning til afsnit B.

CELLETRANSFORMATIONSTEST — PATTEDYRCELLER IN VITRO

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Principper for testmetoden

Kulturer af pattedyrceller kan anvendes til påvisning in vitro af fænotypiske forandringer, som induceres af kemiske forbindelser, der forbindes med maligne transformationer in vivo. Hyppigt anvendte celletyper er C3H10T^{1/2}, 3T3, SHE, Fischer-rotte, og testene bygger på forandringer i cellemorfologien, vækstevnen eller forankringsevnen i blød agar. Der findes også mindre hyppigt anvendte systemer, som bruges til undersøgelse af andre fysiologiske eller morfologiske forandringer i celler som følge af eksponering for karcinogene kemiske forbindelser. Der er ikke beskrevet nogen direkte virkningsmekanistisk forbindelse mellem cancer og de genetiske endpoints, der anvendes i disse in vitro tests. Nogle af testsystemerne kan anvendes til påvisning af tumorpromotorer. Den cytotoxiske effekt kan bestemmes ved måling af teststoffets påvirkning af evnen til at danne kolonier (kloningsstyrken) eller af kulturernes vækstrate. Formålet med at måle den cytotoxiske effekt er at konstatere, om eksponeringen for teststoffet er toksikologisk relevant, men kan ikke benyttes til beregning af transformationsfrekvensen i alle tests, eftersom nogle kræver lang inkubationstid og/eller overførsel til nye plader.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

*Forberedelser**Celler*

Der kan anvendes en række forskellige cellelinjer eller primærceller afhængigt af, hvilken transformationstest der foretages.

Forsøgslederen må sikre, at de anvendte celler undergår relevante fænotypiske forandringer efter eksponering for kendte karcinogener, og forsøgslederens eget laboratorium må have påvist og dokumenteret den anvendte tests validitet og pålidelighed.

Medium

Der anvendes medier og forsøgsbetingelser i overensstemmelse med den anvendte transformationstest.

Teststof

Teststoffet tilsættes kulturmediet eller opløses eller suspenderes i et egnet vehikel, inden cellerne eksponeres. Den derved opnåede vehikelkoncentration bør ikke påvirke cellernes levedygtighed, vækstrate eller transformationsfrekvens.

Metabolisk aktivering

Cellerne eksponeres for teststoffet både med og uden et eksogent metabolisk aktiveringssystem fra pattedyr. Når der benyttes celler med endogen metabolisk aktivering, bør det være påvist, at aktiveringsformen egner sig til den form for kemisk forbindelse, der testes.

Forsøgsbetingelser

Positive og negative kontroller

Som positiv kontrol anvendes i hvert enkelt forsøg både en direkte virkende kemisk forbindelse og en forbindelse, som kræver metabolisk aktivering. Desuden foretages negativ (vehikel) kontrol.

Følgende kemiske forbindelser kan f.eks. anvendes til positiv kontrol:

- direkte virkende forbindelser:
 - etylmetansulfonat
 - β -propiolacton
- forbindelser som kræver metabolisk aktivering:
 - 2-acetylaminofluoren
 - 4-dimetylaminoazobenzen
 - 7,12-dimetylbenzanthracen.

Når det skønnes relevant, bør der foretages supplerende positiv kontrol med anvendelse af en forbindelse af samme kemiske stofklasse som teststoffet.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes en række forskellige koncentrationer af teststoffet, således at der frembringens koncentrationsafhængige toksiske virkninger. Den højeste koncentration bør medføre en lav overlevelsesgrad, og overlevelsesgraden ved den laveste koncentration bør være af samme størrelsesorden som ved det negative kontrolforsøg. Stoffer, som er relativt uopløselige i vand, testes under anvendelse af passende fremgangsmåder op til opløselighedsgrænsen. Den højeste koncentration af ikke-toksiske teststoffer, som er frit opløselige i vand, fastlægges fra test til test.

Fremgangsmåde

Cellerne eksponeres i en passende periode afhængig af det anvendte testsystem. Dette kan indebære gentagne doseringer med udskiftning af medium (og om nødvendigt ny metabolisk aktivering), hvis der er tale om langvarig eksponering. Celler, hvis endogene metaboliske aktivering er utilstrækkelig, testes både med og uden et passende metabolisk aktiveringssystem. Efter eksponeringen vaskes cellerne frie for teststof, hvorefter de dyrkes med henblik på at lade den transformerede fænotype, testen bygger på, komme til udtryk og med henblik på bestemmelse af transformationsfrekvensen.

Alle resultater efterprøves i et uafhængigt forsøg.

2. DATA

Data opstilles i tabelform og kan foreligge i forskellige former afhængigt af den anvendte test. Der kan f.eks. være tale om optælling på plader, registrering af positive plader eller antal transformerede celler. Når det er relevant, udtrykkes overlevelsesgraden som en procentdel af overlevelsen i kontrolforsøgene, og transformationsfrekvensen udtrykkes som antal transformerede celler pr. overlevende.

Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- den anvendte celletype, antal cellekulturer, metoder til opretholdelse af cellekulturer
- forsøgsbetingelser: teststofkoncentration, anvendt vehikel, inkubationstemperatur, inkubationstid, eksponeringens varighed og frekvens, celletæthed under eksponeringen, det anvendte eksogene metaboliske aktiveringssystem, positiv og negativ kontroller, specifikation af den fænotype testen bygger på, det anvendte selektive system (hvis et sådant er anvendt), begrundelse for valget af doser

-
- metoder til registrering af levedygtige og transformerede celler
 - statistisk evaluering
 - diskussion af resultaterne
 - fortolkning af resultaterne.

3.2. **Evaluering og fortolkning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. **REFERENCER**

Se den generelle indledning til afsnit B.

DOMINANT LETAL TEST — GNAVER

1. METODE**1.1. Indledning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Dominante letale virkninger forårsager, at fostret dør. Nå der ved eksponering for kemiske forbindelser induceres dominante letale mutationer, er dette et tegn på, at forsøgsdyreartens kønscellevæv er blevet afficeret. Der er bred enighed om, at dominante letale gener opstår på grund af kromosomskader (strukturelle og numeriske anomalier). Hvis eksponerede hanners afkom dør på det embryonale stade, kan dette også skyldes toksiske virkninger.

Normalt eksponeres hanner for teststoffet, hvorefter de parres med ueksponerede jomfruelige hunner. Kønscellernes forskellige stadier kan undersøges separat ved anvendelse af på hinanden følgende parringsperioder. Forøgelsen af antallet af døde implantater pr. hun i den eksponerede gruppe i forhold til antallet af døde implantater pr. hun i kontrolgruppen er udtryk for den letale virkning efter implantation. Den letale virkning før implantation kan vurderes på grundlag af optælling af corpora lutea eller ved sammenligning af det totale antal implantater pr. hun i de eksponerede grupper og kontrolgruppen. Den totale dominante letale virkning er summen af de letale virkninger før og efter implantation. Beregningen af den totale dominante letale virkning baseres på sammenligning af antallet af levende implantater pr. hun i forsøgsgruppen og antallet af levende implantater pr. hun i kontrolgruppen. Fald i antallet af implantater i bestemte tidsperioder kan skyldes celledrab (af spermatocytter og/eller spermatogonier).

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden*Forberedelser*

Hvis det er muligt, opløses eller suspenderes teststoffet i fysiologisk saltvand. Kemiske forbindelser, som er uopløselige i vand, opløses eller suspenderes i egnede vehikler. Det anvendte vehikel bør ikke interferere med teststoffet eller have nogen toksisk virkning. Testopløsningen anvendes umiddelbart efter fremstillingen.

*Forsøgsbetingelser***Administrationsmåde**

Normalt gives hele dosis på en gang. Der kan også anvendes dosering ad flere gange, når der er toksikologisk begrundelse herfor. Sædvanligvis indgives teststoffet ved oral intubering eller intraperitoneal injektion. Der kan også benyttes andre former for indgift.

Forsøgsdyr

Rotter eller mus anbefales som forsøgsdyr. Sunde og fuldt kønsmodne dyr fordeles randomiseret i forsøgs- og kontrolgrupper.

Antal og køn

Der anvendes et passende antal hanner under hensyntagen til den spontane variation i den biologiske egenskab, der danner grundlag for testen. Det valgte antal baseres på den på forhånd fastlagte testfølsomhed og signifikansstyrke. I et typisk forsøg vil antallet af hanner være tilstrækkeligt til, at mellem 30 og 50 hunner bliver drægtige i hver parringsperiode.

Negative og positive kontroller

Normalt foretages sideløbende positiv og negativ (vehikel) kontrol i hvert forsøg. Når der foreligger acceptable positive kontrolresultater fra nyligt foretagne forsøg i samme laboratorium, kan disse dog anvendes i stedet for sideløbende positiv kontrol.

Positive kontrolstoffer anvendes i tilstrækkeligt lave doser (f.eks. MMS, i.p., 10 mg/kg) til at vise testens følsomhed.

Dosisniveauer

Der anvendes normalt tre forskellige dosisniveauer. Den største dosis bør forårsage tegn på toksisk virkning eller nedsætte de eksponerede dyrs fertilitet. I nogle tilfælde vil et enkelt højt dosisniveau være tilstrækkeligt.

Grænsetest

Når der er tale om ikke-toksiske stoffer, testes en enkelt dosis på 5 g/kg eller gentagen indgift af 1 g/kg/dag.

Fremgangsmåde

Der kan anvendes flere forskellige doseringskemaer. Normalt gives hele dosis på en gang, men andre skemaer lader sig også anvende.

Hannerne parres efter doseringen individuelt med en eller to ikke-doserede jomfruelige hunner i på hinanden følgende perioder af passende længde. Hunnerne placeres hos hannerne i en periode svarende til mindst en ægcyklus, eller indtil parringen har fundet sted, hvilket konstateres ved tilstedeværelse af sperma i vagina eller en vaginalprop.

Antallet af parringer efter doseringen fastlægges på grundlag af doseringskemaet, som skal sikre, at alle kønscellestadier er repræsenteret efter doseringen.

Hunner aflives i anden halvdel af drægtighedsperioden, og uterus' indhold undersøges med henblik på bestemmelse af antallet af levende og døde implantater. Ovarierne undersøges med henblik på bestemmelse af antallet af corpora lutea.

2.

DATA

Data opstilles i tabelform med angivelse af antal hanner samt antal drægtige og ikke drægtige hunner. Resultaterne af hver enkelt parring, herunder identificering af hver enkelt han og hun anføres individuelt. For hver hun anføres parringsuge, hannens dosis og antallet af levende og døde implantater. Beregningen af den totale dominante letale virkning baseres på sammenligning af antallet af levende implantater pr. hun i forsøgsgruppen og antallet af levende implantater pr. hun i kontrolgruppen. Forholdet mellem døde og levende implantater i forsøgsgruppen sammenlignes med forholdet i kontrolgruppen med henblik på bestemmelse af den letale virkning efter implantation.

Hvis data registreres som tidlige og sene dødsfald, skal dette fremgå af tabellerne. Hvis der foretages vurdering af den letale virkning før implantation, anføres denne. Den letale virkning før implantation kan beregnes som forskellen mellem antallet af corpora lutea og antallet af implantater eller som et lavere gennemsnitligt antal implantationer pr. uterus i forhold til kontrolparringerne.

Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING**3.1. Forsøgsrapport**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- dyreart, stamme, de anvendte dyrs alder og vægt, antal dyr af hvert køn i forsøgs- og kontrolgrupperne
- teststof, bærestof, de anvendte dosisniveauer og begrundelse for valget af disse, negativ og positiv kontrol, toksicitetsdata
- administrationsmåde og doseringens varighed
- parringskema
- metode til konstatering af, om parring har fundet sted
- aflivningstidspunkt
- kriterier for registrering af dominante letale gener
- om muligt dosis-responsforhold
- statistisk evaluering
- diskussion af resultaterne
- fortolkning af resultaterne.

3.2. Evaluering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. REFERENCER

Se den generelle indledning til afsnit B.

CYTOGENETISK TEST — KØNSCELLER FRA PATTEDYR

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Principper for testmetoden

Denne in vivo cytogenetiske test anvendes til konstatering af strukturelle kromosomforandringer i spermatogonier. Den bygger på analyse af mitoser i spermatogonier med henblik på konstatering af kromatid- og kromosomforandringer.

Der benyttes præparationer af testikler fra pattedyr, som har været eksponeret for teststoffet under anvendelse af passende administreringsformer, hvorefter de er blevet aflivet efter forskellige tidsrum. Inden aflivning behandles dyrene desuden med tetrådsinhibitorer som colchicin med henblik på at akkumulere celler på et metafaselignende trin i mitosen (c-metafase). Der fremstilles lufttørrede kromosompræparationer, og præparaterne farves og undersøges mikroskopisk.

Nyttige supplerende oplysninger kan indhentes ved analyse af spermatocytter i diakinese-metafase I med henblik på konstatering af kromosomer med multivalente translokationer, efter at stamcellerne i det spermatogone stadium har været eksponeret for teststoffet.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Teststoffet opløses i isotonisk saltvand. Hvis dette ikke lader sig gøre, opløses eller opslemmes det i et passende vehikel. Opløsningen af teststoffet foretages umiddelbart inden anvendelsen. Hvis der anvendes et vehikel, må det ikke indvirke på teststoffet eller forårsage toksiske effekter.

Administrationsmåde

Sædvanligvis indgives teststoffet ved oral og intraperitoneal injektion. Der kan også benyttes andre administrationsmåder.

Forsøgsdyr

Oftest anvendes mus og kinesiske hamstre. Andre pattedyr kan også anvendes. Unge, kønsmodne dyr fordeles randomiseret i forsøgsog kontrolgrupper.

Antal dyr

Der anvendes mindst fem hanner til hver forsøgsgruppe og hver kontrolgruppe.

Negative og positive kontroller

Normalt foretages sideløbende positiv og negativ (vehikel) kontrol i hvert forsøg.

Positive kontrolstoffer anvendes i tilstrækkeligt lave doser (f.eks. mitomycin C, i.p., 0,3 mg/kg) til at vise testens sensitivitet.

Dosisniveauer

Der anvendes en enkelt dosis, nemlig enten den største dosis, dyrene kan tåle eller en dosis, som forårsager nogen grad af toksisk virkning. Hvis denne dosis medfører omfattende celledrab, anvendes desuden en mindre dosis med cytotoxisk virkning. Når dosis-responsforholdet ønskes fastlagt, anvendes mindst tre doser (f.eks. til konstatering af en svag positiv respons). Ikke toksiske stoffer testes under anvendelse af så store doser som praktisk muligt, både når hele dosis gives på en gang, og når den indgives over flere gange.

Fremgangsmåde

Normalt gives forsøgsdyrene hele dosis på en gang. Fra den gruppe, som har modtaget den største dosis, udtages prøver tre gange efter doseringen. Den vigtigste prøveudtagning foregår efter 24 timer. Herudover anvendes et tidligere og et senere prøveudtagningstidspunkt passende placeret mellem seks og 48 timer, idet teststoffet kan have indflydelse på cellecykluskinetikken. Hvis der benyttes mere end en dosis, udtages der prøver på det tidspunkt, hvor effekten er størst, eller, såfremt dette ikke kendes, efter 24 timer.

Teststoffet kan indgives ad flere gange, og prøveudtagningen foregår i så fald seks og 24 timer efter eksponeringens endelige afslutning. Et enkelt prøvetagningstidspunkt kan anvendes, hvis det er videnskabeligt begrundet.

Præparation af testikler

Med henblik på analyse af mitoser i spermatogonierne injiceres tetrådsinhibitorer som colchicin intraperitonealt i forsøgsdyrene. Derefter aflives dyrene efter et passende tidsrum, der for mus ligger mellem tre og fem timer, og for kinesiske hamstre kan være over fem timer.

Der anvendes lufttørringsteknik. Anvendelsen af forskellige dyrearter kan her medføre, at standardproceduren må modificeres. Cellerne bringes i suspension, behandles med hypotonisk opløsning og fikseres. Derefter udbredes de på objektglas og farves. Inden den mikroskopiske analyse kodes objektglassene.

Analyse

Mindst 100 velpræparerede mitotiske metafaser med det fulde antal centromerer undersøges for strukturelle kromosomforandringer. Desuden kan forholdet mellem spermatogonielle mitoser i første og anden meiotiske metafase bestemmes i et udvalg på 100 celler i delingsfase pr. dyr med henblik på konstatering af mulige cytotoxiske effekter.

2.

DATA

Data opstilles i tabelform. Alle former for forandringer anføres separat for hvert dyr i forsøgs- og kontrolgrupperne. Det samlede antal analyserede celler og antallet af afvigende celler anføres. For alle parametre angives middelværdi og standardafvigelse. Det gennemsnitlige forhold mellem spermatogoniernes mitoser og første og anden meiotiske metafase anføres for hver forsøgs- og kontrolgruppe i tabelform, hvis det er blevet bestemt.

Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING**3.1. Forsøgsrapport**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- handyrenes art og stamme, alder og vægt
- antal dyr i forsøgs- og kontrolgrupperne
- forsøgsbetingelser, detaljeret beskrivelse af fremgangsmåde, dosisniveauer, opløsningsmidler og tetrådsinhibitor
- antal analyserede celler pr. dyr i hver gruppe
- afvigelsesnes antal og art anført separat for hvert dyr i forsøgs- og kontrolgrupperne
- statistisk evaluering
- diskussion af resultaterne
- fortolkning af resultaterne.

3.2. Evaluering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. REFERENCER

Se den generelle indledning til afsnit B.

SPOTTEST — MUS

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Principper for testmetoden

Spottesten er en in vivo test i mus, hvor musefostre på det embryonale stade eksponeres for kemiske forbindelser. Målcellerne i fostrene er melanoblasterne, og målgenerne er de gener, der bestemmer pelshårenes pigmentering. Fostrene er heterozygote i et antal af disse pelsfarvegener. Ved mutation eller tab af det dominante allel i en melanoblast ved en række genetiske hændelser kommer den recessive fænotype til udtryk i de celler, der dannes fra denne stamcelle, hvilket fører til anderledes farvede pletter i musens pels. Mængden af afkom med sådanne pletter, dvs. mutationer, registreres og sammenlignes med den tilsvarende mængde blandt afkom af hunmus, der kun har været eksponeret for opløsningsmidlet. Ved spottesten i mus konstateres formodede somatiske mutationer i fosterceller.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Teststoffet opløses eller suspenderes så vidt muligt i isotonisk saltvand. Kemiske forbindelser, som er uopløselige i vand, opløses eller suspenderes i passende vehikler. Det anvendte vehikel må ikke indvirke på teststoffet eller forårsage toksiske effekter. Fremstillingen af teststofpræparationen foretages umiddelbart inden anvendelsen.

Forsøgsdyr

Mus af stammen T-stock (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, $c^{ch}p/c^{ch}p$; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) parres med enten stammen HT-stock (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, ln fz/ln fz; pearl pe/pe) eller C57 BL (nonagouti, a/a). Andre egnede krydsninger som NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) og DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute, d/d) kan anvendes, under forudsætning af, at afkommet er nonagouti.

Antal og køn

Der anvendes et antal drægtige hunner, som er tilstrækkeligt stort til, at der produceres en passende mængde afkom for hver af de anvendte doser. Holdstørrelsen kan anslås på grundlag af antallet af observerede pletter hos de eksponerede mus og kontrolgruppes størrelsesorden. Et resultat kan først accepteres som negativt, hvis mindst 300 unger af hunner, som har været eksponeret for den største dosis, er undersøgt.

Positive og negative kontroller

Der foretages sideløbende kontrol med mus som kun eksponeres for vehikel (negativ kontrol). Historiske kontroldata fra samme laboratorium kan, under forudsætning af at der er tale om homogene data, indregnes med

henblik på at forøge testens sensitivitet. Der bør foreligge positive kontroldata fra nyligt foretagne forsøg i samme laboratorium med en kemisk forbindelse, som vides at være mutagen i denne test, i tilfælde af at der ikke konstateres nogen mutagen virkning af teststoffet.

Administrationsmåde

Sædvanligvis indgives teststoffet ved oral intubering eller intraperitoneal injektion i de drægtige hunner. Inhalation og andre administrationsmåder kan anvendes, hvis de er hensigtsmæssige.

Dosisniveauer

Der anvendes mindst to doseringer, hvoraf den ene skal medføre tegn på toksisk virkning eller reduceret kuldstørrelse. Ikke-toksiske stoffer testes under anvendelse af så store doser som praktisk muligt.

Fremgangsmåde

Normalt gives forsøgsdyrene hele dosis på en gang på drægtighedsperiodens dag 8, 9 eller 10, idet dag 1 er den dag, vaginalproppen observeres første gang. Disse dage svarer til 7,25, 8,25 og 9,25 dage efter befrugtningen. Gentagne doseringer kan foretages på disse dage.

Analyse

Afkommet blindkodes og eventuelle pigmenterede pletter registreres mellem tre og fire uger efter fødslen. Der skelnes mellem tre typer pletter:

- a) hvide pletter inden for en afstand af 5 mm fra den ventrale midtlinie; disse pletter antages at være et resultat af celledrab (WMVS)
- b) gule agouti-agtige pletter på eller omkring pattevorter, kønsåbninger, strube, axiller, lyske og midt i panden; disse pletter antages at være et resultat af fejlifferentiering (MDS)
- c) pigmenterede og hvide pletter tilfældigt fordelt i pelsen; disse pletter antages at være et resultat af somatiske mutationer (RS).

Alle tre typer registreres, men kun den sidstnævnte, RS, er genetisk relevant. Hvis der er problemer med at skelne mellem MDS og RS, kan der benyttes fluorescensmikroskopi af hårprøver.

Synlige morfologiske abnormiteter hos afkommet registreres også.

2. DATA

Det samlede antal undersøgte unger og antal unger med en eller flere pletter, som antages at være et resultat af somatisk mutation, anføres. Data fra forsøgsgrupper og negativ kontrolgruppe sammenlignes ved hjælp af egnede statistiske metoder. Data anføres også pr. kuld.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapporten

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- de anvendte stammer
- antal drægtige hunner i forsøgs- og kontrolgrupperne
- den gennemsnitlige kuldstørrelse i forsøgs- og kontrolgrupperne ved fødslen, og når ungerne er vænnet fra
- dosisniveauer
- opløsningsmiddel

-
- den dag i drægtighedsperioden, hvor doseringen finder sted
 - administreringsform
 - det samlede antal undersøgte unger og antal unger med WMVS, MDS og RS i forsøgs- og kontrolgrupperne
 - makroskopiske morfologiske abnormiteter
 - om muligt dosis-responsforhold for RS
 - statistisk evaluering
 - diskussion af resultaterne
 - fortolkning af resultaterne.

3.2. **Evaluering og fortolkning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. **REFERENCER**

Se den generelle indledning til afsnit B.

ARVELIG TRANSLOKATION HOS MUS

1. METODE**1.1. Indledning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Ved test af arvelig translokation hos mus konstateres strukturelle og numeriske kromosomforandringer i pattedyrskønsceller udtrykt i førstegenerations afkom. Kromosomforandringerne, der måles, er reciprokke translokationer, og, når afkommet også omfatter hundyr, tab af et X-kromosom. Bærere af translokationer og XO-hunner har nedsat fertilitet, hvilket udnyttes ved udvælgelsen af F₁-afkom med henblik på cytogenetisk analyse. Visse typer translokationer (X-autosome og c-r-typen) forårsager fuldstændig sterilitet. Translokationer konstateres cytogenetisk i meiosens diakinese-metafase I hos hanner, som enten kan være af F₁-generationen eller sønner af F₁-hunner. XO-hunner identificeres cytogenetisk ved, at kromosomtallet i knoglemarvmitoser kun er 39.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden*Forberedelser*

Teststoffet opløses i isotonisk saltvand. Uopløselige stoffer opløses eller suspenderes i egnede vehikler. Teststofopløsning anvendes umiddelbart efter fremstillingen. Hvis der anvendes et vehikel med henblik på at lette doseringen, må det ikke interferere med teststoffet eller have nogen toksisk virkning.

Administrationsmåde

Sædvanligvis indgives teststoffet ved oral intubering eller intraperitoneal injektion. Andre administrationsmåder kan være hensigtsmæssige.

Forsøgsdyr

Som forsøgsdyr benyttes mus, idet disse giver de letteste betingelser med hensyn til avl og cytologisk verifikation. Der kræves ikke nogen bestemt stamme. Hvis det påregnes at teste fertiliteten, bør den anvendte stammes gennemsnitlige kuldstørrelse være over otte og relativt konstant. Der anvendes sunde kønsmodne dyr.

Antal dyr

Det nødvendige antal dyr afhænger af den spontane translokationsfrekvens og den induktionsfrekvens, som er nødvendig for at opnå et positivt resultat.

Normalt gennemføres testen ved undersøgelse af F₁-hanner. Der undersøges mindst 500 F₁-hanner pr. dosis. Hvis der tillige anvendes F₁-hunner, undersøges 300 af hvert køn.

Negative og positive kontroller

Adækvate kontroldata, stammende fra sideløbende og historiske kontrolforsøg, skal være tilgængelige. Når der foreligger acceptable positive kontrolresultater fra undersøgelser foretaget for nyligt i det samme laboratorium, kan disse anvendes i stedet for en sideløbende positiv kontrol.

Dosisniveauer

Der testes en dosis, normalt den største dosis med minimal toksisk virkning, men uden indflydelse på reproduktion eller overlevelse. Hvis dosis-responsforholdet skal bestemmes, anvendes yderligere to mindre doser. Ikke-toksiske stoffer testes under anvendelse af så store doser som praktisk muligt.

Fremgangsmåde

Eksposering og parring

Der kan anvendes to forskellige eksponeringskemaer. I det hyppigst anvendte skema gives hele dosis på en gang. Teststoffet kan også gives syv dage om ugen i 35 dage. Antallet af parring efter eksponeringen afhænger af eksponeringskemaet og skal være stort nok til at sikre, at alle eksponerede kønslestadier kan undersøges. Efter parringen placeres hunnerne i hver sit bur. Ved fødslen registreres dato, kuldstørrelse og afkomets køn. Alle hanner blandt afkommet vænnes fra og hunnerne frasorteres, medmindre de medtages i forsøget.

Test af heterozygoti efter translokation

Der anvendes en af to mulige metoder:

- fertilitetsundersøgelse af F_1 -generationen med efterfølgende verifikation af mulige translokationsbærere ved hjælp af cytogenetisk analyse
- cytogenetisk analyse af alle F_1 -hanner uden forudgående udvælgelse på grundlag af fertilitetsundersøgelser.

a) Fertilitetsundersøgelse

Nedsat fertilitet hos F_1 -generationens medlemmer kan konstateres ved observation af kuldstørrelsen og/eller analyse af de parrede hundrys uterusindhold.

Forinden fastlægges der kriterier for normal og nedsat fertilitet hos den anvendte stamme.

Observation af kuldstørrelse: De F_1 -hanner, som skal undersøges, placeres i hver sit bur sammen med hunner fra samme forsøg eller fra bestanden. Fra og med 18 dage efter parringen iagttages burene dagligt. Kuldstørrelse og køn i F_2 -generationen registreres ved fødslen, hvorefter kuldene fjernes. Hvis der testes F_1 -hunner, bevares de små F_2 -kuld med henblik på yderligere undersøgelser. Konstatering af, om hunner er translokationsbærere, forgår ved cytogenetisk analyse af translokation hos en vilkårlig han blandt deres afkom. XO-hunner identificeres gennem ændring af forholdet mellem hanner og hunner i deres afkom fra 1:1 til 1:2. Ved en sekventielt ordnet fremgangsmåde elimineres normale F_1 -dyr fra den videre undersøgelse, hvis størrelsen af det første F_2 -kuld er lig med eller højere end en på forhånd fastsat normalværdi. I modsat fald observeres det andet eller tredje F_2 -kuld. F_1 -dyr, der ikke kan klassificeres som normale efter observation af op til tre F_2 -kuld underkastes enten yderligere undersøgelse ved analyse af de parrede hunners uterusindhold eller ved direkte cytogenetisk analyse.

Analyse af uterusindholdet: Den nedsatte kuldstørrelse hos translokationsbærere skyldes, at fostrene dør på det embryonale stade, så et stort antal døde implantater tyder på translokation hos forsøgsdyret. De F_1 -hanner, som skal undersøges, parres hver især med to til tre hunner. Ved daglig undersøgelse mellem kl. 10 og 12 om formiddagen af forekomsten af vaginalprop, konstateres det, om befrugtning har fundet sted. Hunnerne aflives 14 til 16 dage senere, og antallet af levende og døde implantater i uteri registreres.

b) Cytogenetisk analyse

Der fremstilles testikelpræparater ved lufttørringsteknik. Translokationsbærere identificeres på grundlag af multivalente konfigurationer i primære spermatocytters diakinese-metafase I. Hvis der observeres mindst to celler med multivalente konfigurationer betragtes det som bevis, at forsøgsdyret er translokationsbærer.

Når der ikke gennemføres udvælgelse på basis af fertilitetsundersøgelser, undersøges alle F_1 -hanner cytogenetisk. Der foretages mikroskopisk undersøgelse af mindst 25 diakinesemetafaser I pr. han. F_1 -hanner med små testikler og defekt meiose, som standser før diakinesen, samt F_1 -hunner, som formodes at være XO-bærere, underkastes undersøgelse af mitotiske metafaser i spermatogonier eller knoglemarv. Hvis der observeres usædvanlig lange og/eller korte kromosomer i ti celler, betragtes det som påvist, at der er tale om en translokation, som gør hanner sterile (c-t-typen). Visse X-autosome translokationer, som gør hanner sterile, kan kun identificeres ved båndanalyse af mitosekromosomer. Hvis der observeres 39 kromosomer i ti mitoser, betragtes det som påvist, at der er tale om en XO-hun.

2. DATA

Data opstilles i tabelform.

Den gennemsnitlige kuld størrelse og kønsfordeling i forældregenerationens afkom ved fødslen og ved afvænningen angives for hver parringsperiode.

Med henblik på vurdering af F_1 -dyrenes fertilitet anføres den gennemsnitlige kuld størrelse efter de normale parringer og hver enkelt kuld størrelse efter parring af F_1 -translokationsbærere. Efter analyse af uterusindhold anføres det gennemsnitlige antal levende og døde implantater efter normale parringer og antallet af levende og døde implantater efter hver enkelt parring af F_1 -translokationsbærere.

Efter cytogenetisk analyse af diakinese-metafaser I anføres antallet af multivalente konfigurationer og det totale antal undersøgte celler for hver enkelt translokationsbærer.

Det samlede antal parringer og parringsperiodernes længde anføres for sterile F_1 -dyr. Der gives detaljerede oplysninger om testikelvægt og cytogenetisk analyse.

Den gennemsnitlige kuld størrelse, F_2 -afkommets kønsfordeling og resultaterne af den cytogenetiske analyse anføres for XO-hunner. Hvis mulige F_1 -translokationsbærere udvælges ved fertilitetsundersøgelser, skal tabellerne indeholde oplysninger om, hvor mange af de udvalgte dyr der senere viste sig at være heterozygote efter translokation.

Data fra negative og positive kontrolforsøg rapporteres på lignende måde.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- stamme, dyrenes alder, de doserede dyrs vægt, antal dyr af hvert køn i forsøgs- og kontrolgrupperne i forældregenerationen
- antal af forældredyr af hvert køn i forsøgs- og kontrolgrupper
- forsøgsbetingelser, detaljeret beskrivelse af dyrenes behandling, dosisniveau, opløsningsmidler, parringsschema
- afkommets antal og køn for hver enkelt hun, antal og køn af afkom, som opdrættes med henblik på translokationsanalyse
- translokationsanalytiske kriterier og analysetidspunkt
- antal translokationsbærere samt detaljeret beskrivelse af disse, herunder avlingsdata og oplysninger om uterusindhold, hvis sådanne foreligger
- cytogenetisk fremgangsmåde og detaljerede oplysninger om den mikroskopiske analyse, helst vedlagt billeder
- statistisk evaluering
- diskussion af resultaterne
- fortolkning af resultaterne.

3.2. Evaluering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. REFERENCER

Se den generelle indledning til afsnit B.

AFSNIT C: METODER TIL BESTEMMELSE AF ØKOTOKSICITET**GENEREL INDLEDNING: AFSNIT C**

De herunder beskrevne undersøgelsesmetoder er metoder til bestemmelse af visse af de økotoxikologiske egenskaber, der er opregnet i bilag VIII til direktiv 79/831/EØF. Anmeldere gøres opmærksom på, at teksten ikke omfatter metoder til bestemmelse af følgende egenskaber, som er omhandlet under niveau 1 i bilag VIII:

- forlænget toksicitetsundersøgelse på *Daphnia magna*
- undersøgelse på højerestående plante
- forlænget toksicitetsundersøgelse på en fiskeart
- undersøgelse med henblik på akkumulering i en art.

Når der er færdigudviklet egnede undersøgelsesmetoder til bestemmelse af disse egenskaber, vil de blive offentliggjort i form af en yderligere tilpasning til den tekniske udvikling. I mellemtiden skal anmeldere anvende passende, internationalt anerkendte metoder, som meddeles vedkommende myndighed.

ALGER — VÆKSTHÆMNINGSTEST

1. METODE

1.1. Indledning

Formålet med denne test er at bestemme virkningerne af et stof på encellede grønalgarters vækst. Ved relativt kortvarige tests kan virkningerne over flere generationer vurderes. Denne metode kan tilpasses, så den kan bruges i forbindelse med adskillige encellede algearter; når det er tilfældet, må der gives en beskrivelse af den anvendte metode sammen med testrapporten.

Denne metode anvendes lettest for vandopløselige stoffer, der under testbetingelserne forventelig vil forblive i vandet.

For stoffer, hvis opløselighed i testmediet er begrænset, vil det måske ikke være muligt at bestemme EC_{50} kvantitativt (se definitionerne nedenfor).

Metoden kan anvendes for stoffer, der ikke har direkte indvirkning på målingen af algevækst.

Følgende oplysninger kan være nyttige, når denne test foretages:

- vandopløselighed
- damptryk
- strukturformel
- stoffets renhed
- kemisk stabilitet i vand og lys
- metoder til kvantitativ analyse af stoffet i vand
- pK_a -værdi
- n-octanol/vand-fordelingskoefficient
- resultaterne af en test for let bionedbrydelighed.

1.2. Definitioner og enheder

Cellekoncentration er antallet af celler pr. ml.

Vækst er forøgelsen af cellekoncentrationen i løbet af testperioden.

Vækstrate er forøgelsen af cellekoncentrationen pr. tidsenhed.

Ved EC_{50} forstås i denne metode den teststofkoncentration, der medfører en 50% reduktion af enten væksten eller vækstraten i forhold til kontrolprøven.

Ved NOEC (no observed effect concentration) forstås i denne metode den højeste testkoncentration, hvor de målte parametre ikke viser nogen signifikant hæmning af væksten i forhold til kontrolværdier.

1.3. Referencestoffer

Der kan foretages test med et referencestof med henblik på at påvise utilfredsstillende testbetingelser. Hvis der anvendes et referencestof, må resultaterne angives i testrapporten. Som referencestof kan bruges kaliumdi-chromat.

1.4. Testmetodens princip

Kulturer af udvalgte grønalger med eksponentiel vækst udsættes for forskellige koncentrationer af teststoffet i flere generationer under veldefinerede betingelser. Væksthæmningen i forhold til en kontrolkultur bestemmes over en given periode.

1.5. **Kvalitetskriterier**1.5.1. *Betingelser for testens gyldighed*

Cellekoncentrationen i kontrolkulturerne skal være øget med en faktor på mindst 16 i løbet af tre dage.

At teststoffet forsvinder fra vandet ind i biomassen, gør ikke nødvendigvis testen ugyldig.

1.6. **Beskrivelse af testmetoden**1.6.1. *Forberedelser*1.6.1.1. **Udstyr og materialer**

- Normalt laboratorieudstyr
- Testkolber af passende rumfang (f.eks. er 250 ml koniske kolber passende, når testopløsningens rumfang er 100 ml)
- Dyrkningsapparat: et skab eller kammer, hvori der med en tolerance på $\pm 2^\circ \text{C}$ kan holdes en temperatur inden for området 21 til 25°C , og med ensartet belysning i spektralområdet 400 til 700 nm. (En flux på $0,72 \times 10^{20}$ fotoner/m²s med en tolerance på $\pm 20\%$ anbefales. Denne flux svarer til 120 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ og kan opnås med universelle fluorescerende lamper af hvid type (lystemperatur på ca. 4 200 K), der giver ca. 8 000 lux målt med en sfærisk kollektor)
- Apparat til bestemmelse af cellekoncentrationer, f.eks. elektronisk partikeltæller, mikroskop med tællekammer, fluorimeter, spektrofotometer eller kolorimeter (NB: for at få effektive målinger af lave cellekoncentrationer ved brug af spektrofotometer kan det være nødvendigt at anvende kugler med en lysvej på mindst 4 cm).

1.6.1.2. **Algeme dium**

Nedenstående medium anbefales:

NH ₄ Cl:	15	mg/l,
MgCl ₂ ·6H ₂ O:	12	mg/l,
CaCl ₂ ·2H ₂ O:	18	mg/l,
MgSO ₄ ·7H ₂ O:	15	mg/l,
KH ₂ PO ₄ :	1,6	mg/l,
FeCl ₃ ·6H ₂ O:	0,08	mg/l,
Na ₂ EDTA·2H ₂ O:	0,1	mg/l,
H ₃ BO ₃ :	0,185	mg/l,
MnCl ₂ ·4H ₂ O:	0,415	mg/l,
ZnCl ₂ :	3×10^{-3}	mg/l,
CoCl ₂ ·6H ₂ O:	$1,5 \times 10^{-3}$	mg/l,
CuCl ₂ ·2H ₂ O:	10^{-5}	mg/l,
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O:	7×10^{-3}	mg/l,
NaHCO ₃ :	50	mg/l.

Efter egalisering med luft er dette mediums pH ca. 8.

Ovenstående anbefaling udelukker ikke, at der anvendes andre medier, forudsat at følgende grænser for hovedbestanddelene overholdes:

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

Det anbefalede medium og det i reference 1 angivne medium opfylder dette krav.

1.6.1.3. **Testorganismer**

Udvælgelse af art

Det foreslås, at den grønalge, der anvendes, er en hurtigtvoksende art, som er bekvem for dyrkning og test. Følgende arter betragtes som egnede:

- *Selenastrum capricornutum* ATCC 22662
- *Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG
- *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11b.

Hvis der anvendes andre arter, må stammen rapporteres.

1.6.1.4. Testprofil

Initial cellekoncentration

Det anbefales, at testkulturernes udgangscellekoncentration er ca. 10^4 celler/ml for *Selenastrum capricornutum* og *Scenedesmus subspicatus*. Hvis der anvendes andre arter, skal biomassen være sammenlignelig.

Teststofkoncentrationer

Det testområde, hvori det er sandsynligt, at der opstår virkninger, bestemmes på grundlag af resultaterne af en forprøve. Til testen udvælges mindst fem koncentrationer i en kvotientrække. Den laveste prøvede koncentration må ikke have haft nogen observeret virkning på algerne. Den højeste prøvede koncentration skal hæmme væksten med mindst 50 % i forhold til kontrolkulturen og helst helt standse væksten.

Gentagelser og kontrolkoncentrationer

I testprofilen bør helst indgå tre gentagelser af hver testkoncentration og ideelt dobbelt så mange kontrolkulturer. Hvis der er rimelig grund til det, kan testprofilen ændres, således at antallet af koncentrationer øges, og antallet af gentagelser pr. koncentration nedsættes.

Hvis der anvendes et vehikel til opløsning af teststoffet, må testprofilen også omfatte ekstra kontrolkulturer, der indeholder vehiklet i den højeste koncentration, der anvendes i testkulturerne.

1.6.2. Fremgangsmåde

Dette afsnit indeholder retningslinjer for test af letopløselige, tungtopløselige og flygtige stoffer.

1.6.2.1. Test af stoffer, der er letopløselige i vand

Testkulturer indeholdende de ønskede teststofkoncentrationer og den ønskede mængde algeinokulum forberedes ved at fortynde prøver af teststofstamopløsninger og af algesuspension med filtreret algemedium.

Dyrkningskolberne rystes og anbringes i dyrkningsapparatet. Det er nødvendigt at holde algerne i suspension og at lette overførsel af CO_2 under testen. Med henblik herpå kan benyttes rystning, omrøring eller beluftning. Kulturerne holdes med en tolerance på $\pm 2^\circ \text{C}$ ved en temperatur inden for området 21 til 25°C .

Cellekoncentrationen i hver kolbe bestemmes mindst 24, 48 og 72 timer efter testens indledning. Der bruges filtreret algemedium til bestemmelse af baggrunden, når der anvendes partikeltællere, og som blindprøve, når der anvendes spektrofotometer.

pH måles ved testens indledning og efter 72 timer.

Opløsningernes pH må normalt ikke afvige med mere end én enhed under testen.

1.6.2.2. Test af stoffer med begrænset vandopløselighed

Når teststoffets opløselighed omtrent svarer til den højeste koncentration, der anvendes i testen, er kun få fravigelser af ovenstående procedure nødvendige for at lave testopløsningerne. En mættet opløsning kan udgøre teststoffets stamopløsninger. En anden metode er at opløse teststoffet i den ønskede koncentration i algemediet, inden algesuspensionen tilsættes.

Stamopløsninger af stoffer med lav vandopløselighed kan fremstilles ved mekanisk dispergering eller ved brug af vehikler med lav toksicitet over for alger som f.eks. organiske opløsningsmidler, emulgatorer eller dispergeringsmidler. Hvis der anvendes et vehikel, bør koncentrationen ikke overstige 100 mg/l, og ekstra kontrolkulturer, hvori vehiklet indgår i den højeste koncentration, der findes i testopløsningerne, skal indgå i testprofilen.

1.6.2.3. Test af flygtige stoffer

Der findes indtil nu ikke nogen generelt anerkendt metode til test af flygtige stoffer. Hvis det vides, at et stof har tilbøjelighed til at fordampe, kan der bruges lukkede testkolber med ekstra luftmelletrum mellem væskeoverflade og prop. Der er fremsat forslag til variationer af denne metode (se *reference 1*).

Det bør forsøges at bestemme den stofmængde, der er tilbage i opløsningerne, og man tilråder den yderste forsigtighed ved fortolkningen af resultater af tests med flygtige kemikalier i et lukket system.

2. DATA OG VURDERING

De målte cellekoncentrationer i testkulturerne og kontrolkulturerne opstilles i tabelform sammen med koncentrationerne af teststofferne og målingstidspunkterne. Middelværdien af cellekoncentrationen for hver teststofkoncentration og for kontrolkulturerne afbildes mod tiden, således at der fremkommer vækstkurver.

Til bestemmelse af forholdet mellem koncentration og virkning bør følgende to metoder anvendes.

2.1. Sammenligning af arealer under vækstkurverne

Arealet under vækstkurverne kan beregnes efter denne formel:

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

hvor:

- A = areal
- N_0 = nominelt antal celler pr. ml på tidspunktet t_0 ,
- N_1 = målt antal celler på tidspunktet t_1 ,
- N_n = målt antal celler på tidspunktet t_n ,
- t_1 = tidspunkt for første måling efter testens indledning,
- t_n = tidspunkt for n'te måling efter testens indledning.

Den procentvise hæmning af cellevæksten for hver teststofkoncentration (I_A) beregnes som forskellen mellem arealet under kontrolvækstkurven (A_c) og arealet under vækstkurven for hver teststofkoncentration (A_t), som:

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

I_A -værdierne afbildes på semilogaritmisk papir eller semilogaritmisk probitpapir mod de tilsvarende koncentrationer. Hvis punkterne er aftegnet på probitpapir, trækkes der på øjemål en ret linje mellem dem, eller der kan trækkes en beregnet regressionslinje, når man kan gå ud fra, at værdierne følger den logaritmiske normalfordeling.

EC_{50} -værdien fremkommer som skæringspunktet mellem (regressions) linjen og en linje parallelt med abscissen ved $I_A = 50\%$. Som entydig betegnelse for denne værdi foreslås det i forbindelse med denne beregningsmetode at bruge symbolet $E_b C_{50}$. I forbindelse med denne testmetode, der fastsætter målinger efter 24, 48 og 72 timer, bliver symbolet $E_b C_{50} (0-72 \text{ h})$.

Andre EC -værdier som f.eks. $E_b C_{10}$ kan også udledes af afbildningen af I_A mod logaritmen til koncentrationen.

2.2. Sammenligning af vækstrater

Den gennemsnitlige specifikke vækstrate (μ) for kulturer med eksponentiel vækst kan udregnes som:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_t}{t_n - t_t}$$

Alternativt kan den gennemsnitlige specifikke vækstrate udledes af regressionslinjens hældning i en afbildning af $\ln N$ mod tiden.

Den procentvise reduktion af den gennemsnitlige vækstrate for hver teststofkoncentration sammenlignet med kontrolværdien afbildes mod logaritmen til koncentrationen. Deres EC_{50} kan aflæses af den herved fremkomne graf. Som entydig betegnelse for den EC_{50} -værdi, der beregnes ved denne metode, foreslås det at bruge symbolet $E_r C_{50}$. Målingstidspunkterne skal angives; f.eks. bliver symbolet $E_r C_{50} (24-48 \text{ h})$, hvis værdien vedrører observationstidspunkterne 24 og 48 timer.

NB: vækstrate er en logaritmisk term, og små ændringer i vækstraten kan medføre store ændringer i biomassen. $E_b C$ og $E_r C$ er derfor ikke numerisk sammenlignelige værdier.

3. RAPPORTERING

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- teststof: data for kemisk identifikation
- testorganismer: oprindelse, laboratoriekultur, stammenummer, dyrkningsmetode
- testbetingelser:
 - dato for testens indledning og afslutning samt dens varighed
 - temperatur

- mediets sammensætning
- dyrkningsapparat
- opløsningernes pH ved testens indledning og afslutning (der bør gives en forklaring, hvis der observeres pH-afvigelser på over én enhed)
- vehikel og metode anvendt til opløsning af teststoffet og vehiklets koncentration i testopløsningerne
- lysstyrke og -kvalitet
- testede koncentrationer (målte eller nominelle)
- resultater:
 - cellekoncentration for hver kolbe på hvert målingspunkt og metode til måling af cellekoncentrationer
 - cellekoncentrationernes middelsværdier
 - vækstkurver
 - grafisk afbildning af forholdet mellem koncentration og virkning
 - EC-værdier og beregningsmetode
 - NOEC
 - andre observerede virkninger.

4. REFERENCER

- (1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 201*, Decision of the Council C(81) 30 Final.
- (2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, *Verfahrensvorschlag »Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge Scenedesmus subspicatus«*, in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

*Tillæg***Eksempel på metode til dyrkning af alger****Generelle bemærkninger**

Formålet med dyrkning på grundlag af nedenstående metode er at opnå algekulturer til toksicitetstests.

Der benyttes egnede metoder, der sikrer, at algekulturerne ikke inficeres med bakterier (ISO 4833). Kulturer som altid har været kimfri er ønskelige, men det er af afgørende betydning, at kulturerne udelukkende består af alger.

Alle operationer skal foretages under sterile forhold, således at forurening med bakterier eller med andre alger undgås.

Udstyr og materiale

Se punkt 1.6.1: Forberedelser og testorganismer.

Metoder til fremskaffelse af algekulturer*Fremstilling af næringsopløsninger (medier)*

Alle mediets næringssalte fremstilles som koncentrerede stamopløsninger og opbevares mørkt og koldt. Disse opløsninger steriliseres ved filtrering eller autoklavering.

Mediet fremstilles ved tilsætning af den korrekte mængde stamopløsning til sterilt destilleret vand, idet det påses, at der ikke sker nogen infektion. For at få et fast medium tilsættes 0,8 % agar.

Stamkultur

Stamkulturerne er små algekulturer, der regelmæssigt overføres til et frisk medium, og som benyttes som udgangstestmateriale. Hvis kulturerne ikke anvendes regelmæssigt, stryges de ud på skråagar. De overføres til et frisk medium mindst hver anden måned.

Stamkulturerne dyrkes i koniske kolber med det rette medium (volumen ca. 100 ml). Når algerne inkuberes ved 20° C i konstant lys, er en ugentlig overførsel nødvendig.

Under overførslen afsættes en vis mængde »gammel« kultur med sterile pipetter i en kolbe med frisk medium, således at initialkoncentrationen for de hurtigtvoksende arters vedkommende er ca. 100 gange mindre end i den gamle kultur.

En arts vækstrate kan bestemmes ud fra vækstkurven. Hvis denne er kendt, er det muligt at skønne, ved hvilken tæthed kulturen skal overføres til det nye medium. Dette må gøres, før kulturen når dødsfasen.

Forkultur

Hensigten med forkulturen er at få en mængde alger, der er passende til inokulering af testkulturer. Forkulturen inkuberes under testbetingelserne og anvendes, medens den stadig er i eksponentiel vækst; det vil normalt sige efter en inkubationsperiode på ca. tre dage. Hvis algekulturerne indeholder misdannede eller abnorme celler, skal de kasseres.

TOKSICITET FOR REGNORME

TEST I SYNTETISK JORD

1. METODE

1.1. Indledning

I denne laboratorietest tilsættes teststoffet til syntetisk jord, hvori der anbringes orme i 14 dage. Efter denne periode (og eventuelt efter syv dage) undersøges stoffets dødelige virkning på regnormene. Testen giver en metode til i løbet af relativt kort tid at foretage en screening af kemikaliers virkning på regnorme ved optagelse gennem huden eller føden.

1.2. Definition og enhed

LC₅₀: Koncentration af et stof, som kan forventes at forårsage 50% af testdyrenes død i løbet af testperioden.

1.3. Referencestof

Der anvendes regelmæssigt et referencestof til påvisning af, at testsystemets følsomhed ikke har ændret sig signifikant.

Som referencestof anbefales analytisk rent chloracetamid.

1.4. Testmetodens princip

Jord er et variabelt medium, så der anvendes en omhyggeligt defineret syntetisk lerjord til denne test. Der holdes voksne regnorme af arten *Eisenia foetida* (se anmærkningen i tillægget) i en veldefineret syntetisk jord, som er behandlet med forskellige koncentrationer af teststoffet. Beholdernes indhold spredes på en bakke 14 dage (og eventuelt syv dage) efter forsøgets indledning, og der optælles for hver koncentration, hvor mange regnorme der har overlevet.

1.5. Kvalitetskriterier

Testen er beregnet til at være så reproducerbar som muligt med hensyn til testsubstrat og organisme. Dødeligheden hos kontroldyrene må ikke overstige 10% ved testens afslutning; ellers er testen ugyldig.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

1.6.1. Materialer

1.6.1.1. Testsubstrat

Der anvendes veldefineret syntetisk jord som grundsubstrat.

a) Grundsubstrat (vægtprocent tørstof)

- 10% sphagnum (så nær pH 5,5 til 6,0 som muligt uden synlige planterester og findelt)
- 20% kaolinholdigt ler, helst med over 50% kaolinit
- ca. 69% industrielt kvartssand (overvejende finsand med over 50% af en partikelstørrelse på 0,05 til 0,2 mm). Hvis stoffet ikke er tilstrækkeligt let at opslæmme i vand, holdes 10 g pr. testbeholder tilbage for blanding med teststoffet senere
- ca. 1% calciumcarbonat (CaCO₃), pulveriseret, kemisk rent, tilsat for at få en pH-værdi på 6,0 ± 0,5.

b) Testsubstrat

Testsubstratet består af grundsubstrat, teststof og deioniseret vand.

Vandindholdet svarer til ca. 25 til 42 vægtprocent af grundsubstratets tørstof. Substratets vandindhold bestemmes ved tørring af en prøve til konstant vægt ved 105° C. Hovedkriteriet er, at den syntetiske jord er befugtet så meget, at der ikke er noget stående vand. Blandingen foretages omhyggeligt, således at der bliver en jævn fordeling af teststoffet og substratet. Metoden for tilsætning af teststoffet til substratet skal rapporteres.

c) Kontrolsubstrat

Kontrolsubstratet består af grundsubstrat og vand. Hvis der anvendes et tilsætningsstof, skal et ekstra kontrolsubstrat indeholde samme mængde af tilsætningsstoffet.

1.6.1.2. Testbeholdere

Glasbeholdere med et rumfang på ca. en liter (hensigtsmæssigt tildækket med plastlåg, skåle eller plastfolie med ventilationshuller), fyldt med en mængde vådt test eller kontrolsubstrat svarende til 500 g substrattørstof.

1.6.2. Testbetingelser

Beholderne opbevares i klimakamre ved en temperatur på $20 \pm 2^\circ \text{C}$ og i konstant lys. Lysstyrken bør være 400 til 800 lux.

Testperioden er på 14 dage, men dødeligheden kan eventuelt vurderes syv dage efter testens indledning.

1.6.3. Fremgangsmåde

Testkoncentrationer

Koncentrationerne af teststof udtrykkes som stoffets vægt i forhold til grundsubstratets tørstofvægt (mg/kg).

Forprøve

Det koncentrationsområde, der netop forårsager dødelighed fra 0 til 100 % kan bestemmes ved en forprøve, der giver viden om de koncentrationsintervaller, der skal anvendes ved den endelige test.

Stoffet bør testes i følgende koncentrationer: 1 000, 100, 10, 1 og 0,1 mg/stof/kg testsubstrat (tørstofvægt).

Hvis der skal foretages en fuldstændig endelig test, vil én testgruppe pr. koncentration og én til den ubehandlede kontrolgruppe med hver ti orme være tilstrækkelig til forprøven.

Endelig test

Resultaterne af forprøven anvendes til at vælge mindst fem koncentrationer i en kvotientrække, der går fra 0 til 100 % dødelighed, og hvor den konstante faktor ikke må være over 1,8.

Ved test med disse koncentrationsrækker vil LC_{50} -værdien og dens konfidensgrænser kunne skønnes med størst mulig nøjagtighed.

Ved den endelige test anvendes der mindst fire testgrupper pr. koncentration og fire ubehandlede kontrolgrupper med hver ti orme. Resultaterne af disse gentagne grupper angives som en middelværdi og en standardafvigelse.

Hvis to på hinanden følgende koncentrationer med et forhold på 1,8 kun giver 0 og 100 % dødelighed, er disse to værdier tilstrækkelige som angivelse for LC_{50} -intervallet.

Blanding af grundsubstratet og teststoffet

Når det er muligt, tilberedes teststoffet uden anden tilsætning end vand. Umiddelbart før testens indledning blandes en emulsion eller dispersion af teststoffet i deioniseret vand eller andet opløsningsmiddel med grundsubstratet eller sprøjtes jævnt ud over dette med en fin kromatografisprøjte eller lignende.

Hvis teststoffet ikke er opløseligt i vand, kan det opløses i den mindst mulige mængde af et passende organisk opløsningsmiddel (f.eks. hexan, acetone eller chloroform).

Kun midler, der let fordamper, må bruges til at opløse, dispergere eller emulgere teststoffet. Testsubstratet belufes inden brug. Den fordampede vandmængde erstattes. Kontrolsubstratet må indeholde eventuelle tilsætningsstoffer i samme mængde.

Hvis teststoffet ikke kan opløses, dispergeres eller emulgeres i organiske opløsningsmidler, blandes en blanding af finsand af formalet kvarts og den til behandling af 500 g tørstofvægt syntetisk jord nødvendige mængde teststof med 490 g tørstofvægt testsubstrat.

For hver testgruppe anbringes en mængde vådt testsubstrat svarende til 500 g tørstofvægt i hver glasbeholder, og ti regnorme, der i 24 timer er blevet tilvænnet i et lignende vådt grundsubstrat og derefter hurtigt afskyllet og afdryppet på filterpapir før brugen, anbringes på testsubstratets overflade.

Beholderne tildækkes med perforerede plastlåg, skåle eller folie for at forhindre, at substratet indtørres, og de opbevares under testbetingelser i 14 dage.

Vurderingerne foretages 14 dage (og eventuelt syv dage) efter testens indledning. Substratet spredes på en plade af glas eller rustfrit stål. Regnormene undersøges, og antallet af overlevende regnorme bestemmes. Regnorme anses for døde, hvis de ikke reagerer på en let, mekanisk påvirkning af forenden.

I tilfælde af at undersøgelsen foretages efter syv dage, fyldes substratet atter i beholderen, og de overlevende regnorme genanbringes på den samme testsubstratoverflade.

1.6.4. Testorganismer

Testorganismerne bør være voksne *Eisenia foetida* (se anmærkningen i tillægget) (mindst to måneder gamle med bælte) af en vægt (våd) på 300 til 600 mg. (Med hensyn til opdrætningsmetode henvises til tillægget).

2. DATA

2.1. Behandling og vurdering af resultaterne

De anvendte teststofkoncentrationer rapporteres med henvisning til den procentvise dødelighed for hver koncentration.

Når de opnåede data er dækkende, kan LC_{50} og dens konfidensgrænser ($p = 0,05$) bestemmes ved brug af standardmetoder (Litchfield and Wilcoxon, 1949, eller tilsvarende metode). LC_{50} angives som mg teststof pr. kg testsubstrat (tørstofvægt).

I de tilfælde, hvor koncentrationskurvens hældning er for stejl til, at LC_{50} kan beregnes, er en grafisk bestemmelse af denne værdi tilstrækkelig.

Hvis to på hinanden følgende koncentrationer med et forhold på 1,8 kun giver 0 og 100% dødelighed, er disse to værdier tilstrækkelige som angivelse for LC_{50} -intervallet.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- angivelse af, at testen er foretaget i overensstemmelse med ovenstående kvalitetskriterier
- angivelse af den foretagne test (forprøve og/eller endelig test)
- nøje beskrivelse af testbetingelserne eller angivelse af, at testen er foretaget i overensstemmelse med metoden; eventuelle afvigelser skal rapporteres
- nøje beskrivelse af, hvorledes teststoffet er blevet iblandet i grundsubstratet
- oplysninger om testorganismer (art, alder, gennemsnitsvægt samt minimums- og maksimumsvægt, betingelserne for avl og opdrætning samt leverandør)
- angivelse af den anvendte metode til bestemmelse af LC_{50}
- testresultaterne, herunder alle anvendte data
- beskrivelse af observerede symptomer eller adfærdsændringer hos testorganismene
- dødelighed i kontrolgrupperne
- LC_{50} eller højeste testkoncentration uden dødelighed og laveste testkoncentration med en dødelighed på 100% 14 dage (og eventuelt syv dage) efter testens indledning.
- afbildning af koncentrations-responskurven
- resultater, der er opnået med referencestoffet enten i forbindelse med den pågældende test eller ved tidligere kvalitetskontrolundersøgelser.

4. REFERENCER

- (1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 207*, Decision of the Council C(81) 30 Final.
- (2) Edwards, C. A. and Lofty, 1977. *Biology of Earthworms*. London: Chapman and Hall, 331 pp.
- (3) Bouche, M. B. 1972. *Lombriciens de France, Écologie et Systématique*. Publ. Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.
- (4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon J., 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharm. Exp. Therap.*, vol. 96, 99—113.
- (5) EEC 1983. *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms*. Report EUR 8714 EN.
- (6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden, in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

*Tillæg***Avl og opdrætning af ormene før test**

Med henblik på avl anbringes 30 til 50 voksne orme i en avlekasse med frisk substrat og fjernes efter 14 dage. Disse dyr kan bruges til avl af senere grupper. De regnorme, der klækkes af kokonerne, anvendes til test, når de er kønsmodne (under de foreskrevne betingelser efter to til tre måneders forløb).

Avls- og opdrætningsbetingelser

- Klimakammer:** temperatur $20 \pm 2^\circ \text{C}$, helst med konstant lys (lysintensitet 400 til 800 lux).
- Avlekasser:** Egnede lave beholdere med et rumfang på 10 til 20 l.
- Substrat:** *Eisenia foetida* kan opdrættes i forskellige dyrekskrementer. Som avlsmedium kan anbefales en blanding af lige dele tørv og ko- eller hestegødning. Substratet må have en pH-værdi på ca. 6 til 7 (justeret med calciumcarbonat) og lav ionledningsevne (under 6 mmhos eller 0,5 % saltkoncentration).

Substratet bør være fugtigt, men ikke for vådt.

Andre egnede fremgangsmåder ud over ovennævnte metode kan benyttes.

Anmærkning: Der findes to racer af *Eisenia foetida*, som nogle systematikere har klassificeret som arter (Bouche, 1972). De er morfologisk set omtrent ens, men den ene, *Eisenia foetida foetida*, har typisk tværgående striber på leddene, hvad den anden, *Eisenia foetida andrei*, ikke har, og dennes farve er rødbrøget. Så vidt muligt bør *Eisenia foetida andrei* anvendes. Andre arter kan anvendes, hvis den fornødne metodik er til rådighed.

BIOLOGISK NEDBRYDNING

ZAHN-WELLENS TEST

1. METODE

1.1. Indledning

Metoden har til formål at vurdere vandopløselige ikke flygtige organiske stoffers potentielle fuldstændige bionedbrydelighed, når de skal udsættes for forholdsvis høje koncentrationer af mikroorganismer under en statisk test.

Der kan forekomme fysisk/kemisk adsorption på de oplømmede artikler, og der må tages hensyn hertil, når resultaterne fortolkes (jf. 3.2).

De stoffer, der skal undersøges, anvendes i koncentrationer svarende til DOC-værdier i området 50 til 400 mg/l eller COD-værdier i området 100 til 1 000 mg/l (DOC = opløst organisk kulstof; COM = kemisk iltforbrug). Disse forholdsvis høje koncentrationer har den fordel, at de i analytisk henseende er pålidelige. Forbindelser med toksiske egenskaber kan hæmme eller hindre nedbrydningsprocessen.

Ved denne metode anvendes måling af koncentrationer af opløst organisk kulstof eller af det kemiske iltforbrug til bedømmelse af teststoffets fuldstændige biologiske nedbrydning.

Samtidig anvendelse af en specifik analysemetode kan muliggøre vurdering af stoffets primære biologiske nedbrydning (dvs. den oprindelige kemiske forbindelses forsvinden).

Metoden finder kun anvendelse på de organiske teststoffer, som ved koncentrationen under testen:

- er opløselige i vand under forsøgsbetingelserne
- har forsvindende lavt damptryk under forsøgsbetingelserne
- ikke hæmmer bakterier
- kun adsorberes i testsystemet i begrænset omfang
- ikke forsvinder fra testopløsningen som følge af skumning.

Oplysninger om mængdeforholdet mellem teststoffets hovedbestandde vil være til nytte ved fortolkning af resultaterne, især hvis disse er lave eller usikre.

Ved fortolkningen af lave resultater og ved valget af passende testkoncentrationer er det ønskeligt at have oplysninger om stoffets giftvirkning over for mikroorganismer.

1.2. Definitioner og enheder

Nedbrydningsgraden ved testens afslutning anføres således: Biologisk nedbrydelighed i Zahn – Wellens Test:

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

hvor:

D_T = biologisk nedbrydning (%) ved tidspunktet T,

C_A = DOC (eller COD)-værdier i forsøgsblandingen, målt tre timer efter igangsætning af testen (mg/l).
(DOC = Opløst organisk kulstof, COD = kemisk iltforbrug)

C_T = DOC- eller COD-værdier i forsøgsblandingen ved tidspunktet for prøveudtagning (mg/l),

C_B = DOC- eller COD-værdi for blindprøven ved tidspunktet for prøveudtagning (mg/l),

C_{BA} = DOC- eller COD-værdi for blindprøven, målt 3 timer efter igangsætning af testen (mg/l).

Nedbrydningsgraden afrundes til nærmeste hele procent.

Den procentvise nedbrydning er angivet som den procentvise DOC- (eller COD-) fjernelse af teststoffet.

Forskellen mellem den værdi, der er målt efter tre timer, og den beregnede, eller helst målte, startværdi kan give nyttige oplysninger om stoffets eliminering (jf. 3.2 »Fortolkning af resultater«).

1.3. Referencestoffer

I visse tilfælde kan referencestoffer være nyttige ved undersøgelse af nye stoffer; der kan dog endnu ikke anbefales bestemte referencestoffer.

1.4. Testmetodens princip

Aktiveret slam, uorganiske næringsstoffer og teststoffet, der er den eneste kulstofkilde i vandig opløsning, anbringes sammen i en glasbeholder på 1 til 4 liter, som er forsynet med omrøring og beluftning. Blandingen omrøres og beluftes ved 20 til 25° C under indirekte belysning eller mørke i op til 28 dage. Nedbrydningsprocessen følges ved bestemmelse af DOC- (eller COD-) værdier i den filtrerede opløsning én gang dagligt eller regelmæssigt med et andet passende mellemrum. Forholdet mellem den eliminerede DOC (eller COD) efter hvert tidsrum og værdien tre timer efter starten udtrykkes som procentvis biologisk nedbrydning og er et mål for nedbrydningsgraden på dette tidspunkt. Resultatet afbildes mod tiden, hvorved kurven over biologisk nedbrydning fremkommer.

Hvis der anvendes en specifik analysemetode, kan ændringer i det oprindelige stofs koncentration som følge af biologisk nedbrydning måles (primær bionedbrydelighed).

1.5. Kvalitetskriterier

Det er ved ringtest godtgjort, at denne metodes reproducerbarhed er tilfredsstillende.

Metodens følsomhed afhænger hovedsagelig af blindprøvens variationer og i mindre grad af nøjagtigheden ved bestemmelsen af opløst organisk kulstof og teststofkoncentrationen i væsken.

1.6. Beskrivelse af fremgangsmåden**1.6.1. Forberedelser****1.6.1.1. Reagenser**

vand: drikkevand med mindre end 5 mg organisk kulstof pr. liter. Koncentrationen af calcium- og magnesiumioner må ikke overstige 2,7 mmol/l tilsammen; i modsat fald må der fortyndes passende med deioniseret eller destilleret vand

svovlsyre, analysen (A.R.):	50 g/l
natriumhydroxidopløsning, A.R.:	40 g/l
opløsning af uorganiske næringsstoffer: i 1 l deioniseret vand opløses:	
Ammoniumchlorid, NH ₄ Cl, A.R.:	38,5 g
Natriumdihydrogenphosphat, NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O, A.R.:	33,4 g
Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄ , A.R.:	8,5 g
Dikaliummonohydrogenphosphat, K ₂ HPO ₄ , A.R.:	21,75 g

Blandingen fungerer dels som næringsstofkilde, dels som buffersystem.

1.6.1.2. Apparatur

glasbeholdere på 1 til 4 (f.eks. cylindriske beholdere)

omrører med rørehoved af glas eller metal på en passende aksel (Omrøreren bør rotere 5 til 10 cm over beholderens bund). Der kan i stedet anvendes en magnetomrører med en 7 til 10 cm lang magnetpind

glasrør med indvendig diameter på 2 til 4 mm til beluftning. Rørets åbning bør befinde sig ca. 1 cm over beholderens bund

centrifuge (ca. 3 550 g)

pH-meter

apparat til måling af opløst ilt

papirfiltre

apparatur til membranfiltrering

membranfiltre med porestørrelse 0,45 µm. Membranfiltre er kun egnede, hvis der er vished for, at de hverken afgiver kulstoff eller absorberer stoffet under filtreringen

analyseudstyr til bestemmelse af indholdet af organisk kulstof og det kemiske iltforbrug.

1.6.1.3. Tilberedning af inoculum

Aktiveret slam fra et biologisk rensningsanlæg vaskes (flere gange) med vand (jf. ovenfor) ved centrifugering eller dekantering.

Det aktiverede slam skal være i passende stand. Sådant slam kan fås fra et velfungerende anlæg til spildevandsrensning. For at få så mange forskellige bakteriestammer som muligt kan det være bedre at blande inocula fra forskellige kilder (f.eks. forskellige rensningsanlæg, jordekstrakter, flodvand osv.).

Det aktiverede slams aktivitet kontrolleres, jf. »egnethedskontrol«.

1.6.1.4. Fremstilling af testopløsningerne

Til testbeholderen sættes 500 ml vand, 2,5 ml opløsning af uorganiske næringsstoffer pr. liter samt en mængde aktiveret slam, der svarer til 0,2 til 1,0 g tørstof pr. liter færdigblanding. Der tilsættes en så stor mængde stamopløsning af teststoffer, at den færdige blanding får en DOC-koncentration på 50 til 400 mg/l. Det tilsvarende COD-interval er 100 til 1 000 mg/l. Der fyldes op til i alt 1 til 4 l med vand. Valg af det samlede volumen afhænger af det antal prøver, der skal udtages til DOC- eller COD-bestemmelser, og det nødvendige analysevolumen.

Normalt kan et volumen på 2 l betragtes som tilstrækkeligt. Mindst én kontrolbeholder (blindprøve) sættes i gang samtidig med hver testserie; den indeholder kun aktiveret slam og opløsning af uorganiske næringsstoffer fortyndet med vand til samme totalvolumen som i testbeholdererne.

1.6.2. Testens gennemførelse

Testbeholderne omrøres med magnetomrørere eller propelomrørere under indirekte belysning eller i mørke ved 20 til 25° C. Beluftning sker med komprimeret luft, der om nødvendigt renses med et vatfilter og en vaskeflaske. Det må påses, at slammet ikke bundfælder, og at iltkoncentrationen ikke falder til under 2 mg/l.

pH-værdien kontrolleres regelmæssigt (f.eks. dagligt) og indstilles om nødvendigt til pH 7 til 8.

Lige før prøveudtagningen kompenseres der for tab ved fordampning ved tilsætning af deioniseret eller destilleret vand. Det kan f.eks. anbefales at afmærke væskehøjden i beholderen før testen startes. Der sættes nye mærker efter hver prøveudtagning (uden beluftning og omrøring). De første-prøver udtages altid tre timer efter testens start, således at det kan konstateres, om testmaterialet adsorberes på det aktiverede slam.

Elimineringen af testmaterialet følges ved DOC- eller COD-bestemmelser dagligt eller regelmæssigt med et andet interval. Prøverne fra testbeholderen og blindforsøget filtreres gennem et omhyggeligt vasket papirfilter. De første 5 ml filtrat bortkastes. Slam, der er vanskeligt at filtrere, kan fjernes ved først at centrifugere i ti min. Der foretages mindst dobbeltbestemmelse af DOC og COD. Testens løber i op til 28 dage.

NB: Prøver, der stadig er uklare, filtreres gennem et membranfilter. Membranfiltrene må hverken afgive eller adsorbere organisk materiale.

Egnethedskontrol af det aktiverede slam

I hver testserie bør indgå en beholder, der indeholder et kendt stof, således at man kan kontrollere egnetheden af det aktiverede slam. Til dette formål er diethylenglycol fundet egnet.

Adaptation

Hvis der foretages analyser med forholdsvis korte mellemrum (f.eks. dagligt), vil adaptation klart fremgå af nedbrydningskurven (jf. figur 2). Testen bør derfor ikke sættes i gang umiddelbart før weekenden.

Hvis der forekommer adaptation ved slutningen af perioden, kan testen fortsættes, indtil nedbrydningen er afsluttet.

NB: Hvis der er behov for større viden om det adapterede slams opførsel, udsættes det samme aktiverede slam endnu engang for det samme testmateriale efter følgende fremgangsmåde:

Omrøringen og beluftningen standses, og man lader det aktiverede slam bundfælde sig. Den ovenstående væske fjernes, der fyldes op til 2 l med vand og omrøres i 15 minutter, og blandingen henstår til ny bundfældning. Efter fjernelse af den ovenstående væske anvendes det tilbageblevne slam til gentagelse af testen med det samme materiale som under punkt 1.6.1.4 og 1.6.2.

Det aktiverede slam kan isoleres ved centrifugering i stedet for bundfældning.

Det adapterede slam kan eventuelt blandes med frisk slam, så man når op på i alt 0,2 til 1,0 g tørstof pr. liter.

Analyse

Normalt filtreres prøver gennem et omhyggeligt vasket papirfilter (til vask anvendes deioniseret vand).

Prøver, der stadig er uklare, filtreres gennem et membranfilter (0,45 µm).

Der foretages dobbeltbestemmelse af DOC-koncentrationen i prøvefiltraterne (de første 5 ml bortkastes) med TOC-instrumentet. Hvis filtratet ikke kan analyseres samme dag, skal det opbevares i køleskab til næste dag. Længere tids opbevaring kan ikke anbefales.

COD-koncentrationen bestemmes i prøvefiltraterne med et COD-analyseudstyr efter den fremgangsmåde, der er beskrevet i reference 2 nedenfor.

2. DATA OG VURDERING

Der foretages mindst dobbeltbestemmelse af DOC- og COD-koncentrationerne i prøverne ifølge 1.6.2. Nedbrydningen ved tidspunktet T beregnes med den formel (med definitioner), der anført under 1.2.

Nedbrydningsgraden afrundes til nærmeste hele procent. Den nedbrydning, der opnås ved slutningen af testen, anføres som »den biologiske nedbrydelighed ved Zahn-Wellens test«.

NB: Hvis der opnås fuldstændig nedbrydning før testperioden er udløbet og dette resultat bekræftes ved endnu en analyse den følgende dag, kan testen afsluttes.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- stoffets begyndelseskoncentration
- alle andre oplysninger og forsøgsresultaterne vedrørende teststoffet, et eventuelt referencestof og blindforsøget
- koncentrationen efter tre timer
- kurve over biologisk nedbrydning med forklaring
- hvornår og hvor prøveorganismene er udtaget, adaptationsgrad, anvendt koncentration osv.
- fyldestgørende begrundelse for alle afvigelser fra fremgangsmåden.

3.2. Fortolkning af resultater

Gradvis fjernelse af DOC (COD) i løbet af dage eller uger viser, at teststoffet nedbrydes biologisk.

Fysisk/kemisk adsorption kan dog i visse tilfælde spille en vis rolle, og et tegn herpå er, at der inden for de første tre timer sker fuldstændig eller delvis fjernelse, og at forskellen mellem supernatant væsken fra kontrolforsøget og prøven bliver liggende på et uventet lavt niveau.

Det er nødvendigt at foretage yderligere testning, hvis der skal skelnes mellem biologisk nedbrydning (eller delvis biologisk nedbrydning) og adsorption.

Dette kan gøres på flere måder, mest troværdigt ved at anvende supernatant væsken som inoculum i en basis sat test (helst en respirometrisk test).

Teststoffer, der giver høj fjernelse af DOC (COD), som ikke skyldes adsorption, ved denne test, bør betragtes som potentielt biologisk nedbrydelige. Delvis fjernelse, som ikke skyldes adsorption, betyder, at kemikaliet i hvert fald i et vist omfang nedbrydes biologisk.

Ringe eller ingen fjernelse af DOC (COD) kan skyldes, at teststoffet hæmmer mikroorganismene; dette kan undertiden også vise sig ved, at slammet opløses og forsvinder, hvorved supernatant væsken bliver uklar. Testen bør gentages med en lavere koncentration af teststoffet.

Anvendelse af en stofs specifik analysemetode eller ^{14}C -mærket teststof kan give større følsomhed. Hvis der anvendes ^{14}C -mærket teststof, vil påvisning af $^{14}\text{CO}_2$ bekræfte, at der er tale om biologisk nedbrydning.

Dersom resultaterne anføres som primær biologisk nedbrydning, bør der om muligt anføres en forklaring på den kemiske strukturændring, som fører til, at analyseresultaterne for det oprindelige teststof falder.

Valget af analysemetode skal underbygges, og analyseresultaterne for blindprøven skal anføres.

4. REFERENCER

- (1) OECD, Paris, 1981 *Test Guideline 302 B*. Decision of the Council C(81) 30 Final
- (2) Bilag V C.9 Nedbrydning: Kemisk iltforbrug. Kommissionens direktiv 84/449/EØF, *De Europæiske Fællesskabers Tidende*, nr. L 251 af 19. 9. 1984.

Tillæg

EKSEMPLER PÅ EVALUERING

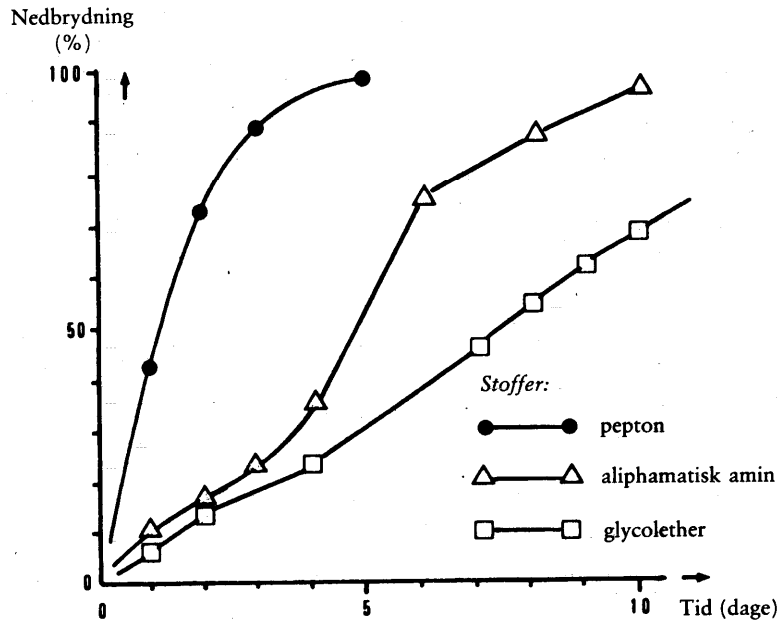
Organisk forbindelse:	4-ethoxybenzoesyre
Teoretisk testkoncentration:	600 mg/l
Teoretisk DOC:	390 mg/l
Inoculum:	rensingsanlægget
Koncentration:	1 g tørstof pr. liter
Eventuel adaptation:	ikke adapteret
Analyse:	DOC-bestemmelse
Testmængde:	3 ml
Kontrolstof:	diethylenglycol
Stoffets toksicitet:	ingen giftvirkning under 1 000 mg/l anvendt prøve: fermenteringsglas

Tidspunkt	Kontrolstof				Teststof		
	Blindprøve DOC ⁽¹⁾ (mg/l)	DOC ⁽¹⁾ (mg/l)	DOC netto (mg/l)	Ned- brydning (%)	DOC ⁽¹⁾ (mg/l)	DOC netto (mg/l)	Nedbrydning (%)
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 timer	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 dag	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dage	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dage	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dage	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dage	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dage	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dage	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dage	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

⁽¹⁾ Gennemsnit af tredobbeltbestemmelse.

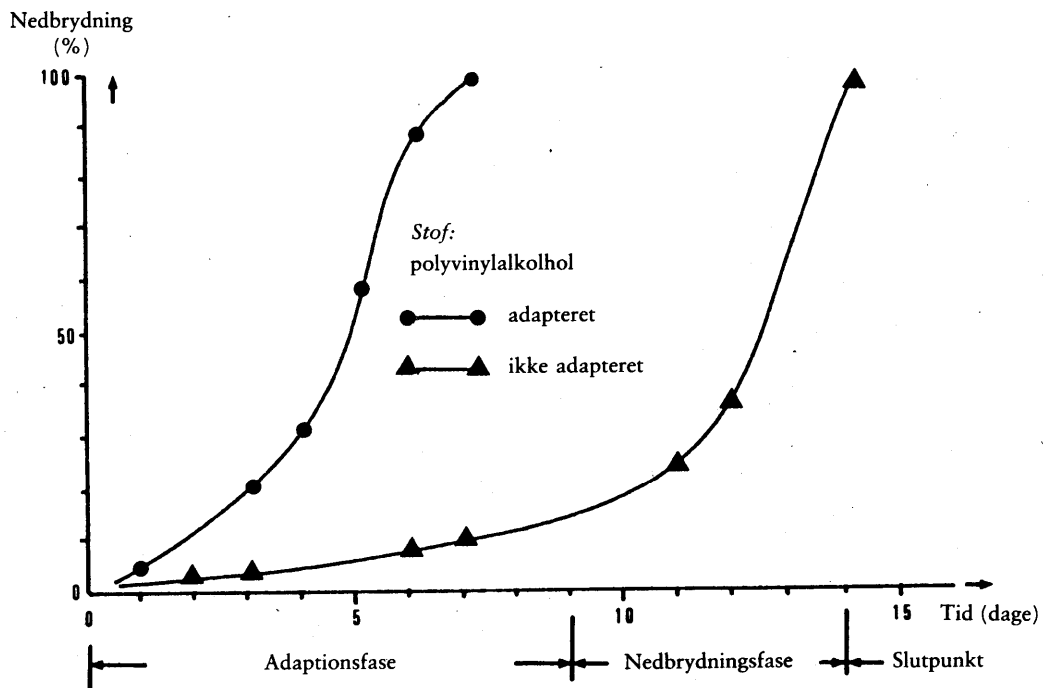
Figur 1

Eksempler på kurver over biologisk nedbrydning



Figur 2

Eksempler på slamadaptation



BIOLOGISK NEDBRYDNING

AKTIVERET SLAM — SIMULATIONSTEST

1. METODE

1.1. Inledning

1.1.1. *Generelle bemærkninger*

Metoden er kun anvendelig for organiske teststoffer, der ved den benyttede testkoncentration:

- er opløselige i vand i det omfang, det er nødvendigt for tilberedning af testopløsningerne
- har et ubetydeligt damptryk under testbetingelserne
- ikke er hæmmende for bakterier.

Oplysninger om de relative mængder af teststoffets hovedbestanddele vil være nyttige for fortolkningen af de opnåede resultater, især i de tilfælde, hvor resultaterne er lave eller marginale.

Oplysninger om stoffets toksicitet for mikroorganismene kan være nyttige for fortolkningen af lave resultater og ved valget af egnede testkoncentrationer.

1.1.2. *Bestemmelse af fuldstændig bionedbrydelighed (DOC/COD-analyse)*

Formålet med metoden er at bestemme den fuldstændige bionedbrydelighed ved måling af fjernelsen af stoffet og eventuelle metabolitter i en aktivslamanlægsmodel ved en koncentration svarende til 12 mg DOC/l (eller ca. 40 mg COD/l); 20 mg DOC/l synes at være optimal. (DOC = dissolved organic carbon, dvs. opløst organisk kulstof; COD = chemical oxygen demand, dvs. kemisk oxygenforbrug).

Teststoffets indhold af organisk kulstof (eller dets kemiske oxygenforbrug) skal fastlægges.

1.1.3. *Bestemmelse af primær bionedbrydelighed (specifik analyse)*

Formålet med metoden er at bestemme den primære bionedbrydelighed af et stof i en aktivslamanlægsmodel ved en koncentration på ca. 20 mg/l ved anvendelse af en specifik analysemetode (der kan benyttes lavere eller højere koncentration, hvis analysemetoden og toksicitetshensyn tillader dette). Herved kan stoffets primære bionedbrydelighed bedømmes (dvs. forsvinden af den oprindelige kemiske forbindelse).

Formålet med denne metode er *ikke* at bestemme teststoffets mineralisering.

Der må foreligge en passende analysemetode til bestemmelse af teststoffet.

1.2. Definitioner og enheder

1.2.1. *DOC/COD-analyse*

Nedbrydningen er defineret som den del af teststoffet, der fjernes, efter følgende formel:

$$DR = \frac{T - (E - E_0)}{T} \times 100\% \quad [1 a)]$$

hvor:

DR = procent DOC (eller COD) fjernet i den givne middellopholdstid med hensyn til teststoffet

T = teststofkoncentrationen i indløbet i mg DOC/l (eller mg COD/l)

E = DOC-koncentration (eller COD-koncentration) i testenhedens udløb i mg DOC/l (eller mg COD/l)

E₀ = DOC-koncentration (eller COD-koncentration) i blindprøveenhedens udløb i mg DOC/l (eller COD/l).

Nedbrydningen angives som den procentdel DOC (eller COD), der fjernes i en given retentionstid med hensyn til teststoffet.

1.2.2. *Specifik analyse*

Den procentdel teststof, der elimineres fra den vandige fase (R_w) i den givne middeleholdstid, fremgår af følgende formel:

$$R_w = \frac{C_1 - C_0}{C_1} \times 100\% \quad [1 \text{ b}]$$

hvor:

C_1 = stofkoncentrationen i testenhedens indløb (mg stof/l, bestemt ved specifik analyse)

C_0 = stofkoncentrationen i testenhedens udløb (mg stof/l, bestemt ved specifik analyse).

1.3. **Referencestoffer**

I nogle tilfælde, hvor et nyt stof undersøges, kan referencestoffer være nyttige; der kan endnu ikke anbefales specifikke referencestoffer.

1.4. **Testmetodens princip**

Til bestemmelse af den endelige bionedbrydelighed benyttes der parallelt to aktiv slam pilotenheder (OECD »Confirmatory testenheder« eller »Porous pot-enheder«). Teststoffet tilsættes til den ene enheds indløb (syntetisk spildevand eller husholdnings-spildevand), medens den anden enhed kun tilføres spildevand. Til bestemmelse af primær bionedbrydning med specifik analyse i indløb og udløb benyttes der kun én enhed.

DOC-koncentrationerne (eller COD-koncentrationerne) måles i udløbene, eller stofkoncentrationerne bestemmes ved specifik analyse.

DOC, som skyldes teststoffet, måles ikke, men angives blot.

Når der foretages DOC-målinger (eller COD-målinger), antages forskellene mellem test- og kontroludløbenes gennemsnitkoncentrationer at skyldes ikke-nedbrudt teststof.

Når der foretages specifikke analyser, kan ændringen i stamforbindelsens koncentration måles (primær bionedbrydning).

Der kan arbejdes med enhederne efter »koblingsmetoden«, hvor der foretages transinokulering.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Stoffets startkoncentration afhænger af, hvilken type analyse der foretages og dens begrænsninger.

1.6. **Beskrivelse af testmetoden**

1.6.1. *Forberedelser*

1.6.1.1. **Apparatur**

Der kræves to enheder af samme type, undtagen når der foretages specifikke analyser. Der er to typer, der kan benyttes:

OECD Confirmatory test:

Udstyret (tillæg I) består af holdetank (A) til syntetisk spildevand, doseringspumpe (B), luftningstank (C), separator (sedimenteringstank) (D), slampumpe (E) til recirkulering af aktiveret slam samt tank (F) til opsamling af det behandlede spildevand.

Tank (A) og (F) skal være af glas eller egnet plast og skal mindst kunne rumme 24 l. Pumpen (B) skal give et konstant flow af syntetisk spildevand til luftningstanken; ethvert egnet system kan benyttes, forudsat at indløbsflow og koncentration er sikret.

Normalt er separatorens højde (D) indstillet således, at luftningstanken indeholder 3 l blandet væske. En sintret luftningsklods (G) er ophængt i tank (C) over keglens spids. Den luftmængde, der blæses gennem luftningstanken, kan kontrolleres ved hjælp af et flowmeter.

Slampumpen (E) er indstillet således, at de aktiverede slam fra separatorens kontinuerligt og regelmæssigt recirkuleres til luftningstanken (C).

Porous pot:

Den porøse krukke laves af porøs polyethylenplade (2 µm tyk, maksimal porestørrelse 95 µm), der formes til cylindre med en diameter på 14 cm og en konisk bund, der danner en vinkel på 45° med siderne (figur 1 og 2 i tillæg II). Den porøse krukke anbringes i en uigennemtrængelig beholder af egnet plastic med en diameter på 15 cm og et udtag i 17,2 cm højde på den cylindriske del, som bestemmer, hvor meget krukken kan rumme (3 l). Der er en stiv støttering af egnet-plast omkring den indre beholders øverste kant, således at der er 0,5 cm plads til udløbsvand mellem den indre og den ydre beholder.

De porøse krukker kan opstilles på bunden af et termostatstyret vandbad. Den indre beholder tilføres luft i bunden, hvorpå der er anbragt egnede luftningsklodser.

Beholder (A) og (E) skal være af glas eller egnet plast og mindst kunne rumme 24 l. Pumpen (B) skal give et konstant flow af syntetisk spildevand til luftningstanken; ethvert egnet system kan benyttes, forudsat at indløbsflow og koncentration er sikret.

Der er behov for ekstra indre porøse krukker til erstatning af krukker, der måtte blive tilstoppet; tilstoppede krukker renses ved 24 timers neddykning i en hypochloritopløsning efterfulgt af grundig afskyllning i ledningsvand.

1.6.1.2. Filtrering

Membranfiltreringsapparat og membranfiltre med en porestørrelse på 0,45 µm. Membranfiltre er egnede, hvis det sikres, at de hverken afgiver kulstof eller adsorberer teststoffet under filtreringen.

1.6.1.3. Spildevand

Der kan anvendes enten syntetisk spildevand eller husholdningsspildevand.

Eksempel på syntetisk spildevand pr. liter ledningsvand opløses:

pepton:	160 mg
kødekstrakt:	110 mg
urea:	30 mg
NaCl:	7 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O:	4 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O:	2 mg
K ₂ HPO ₄ :	28 mg.

Husholdningsspildevand:

Husholdningsspildevandet indsamles frisk hver dag fra overløbet fra primærsedimenteringstanken i et rensningsanlæg, der overvejende behandler husholdningsspildevand.

1.6.1.4. Stamopløsning af teststof

Der fremstilles en opløsning af teststoffet (f.eks. 1%) for tilsætning til testenheden. Stofkoncentrationen skal bestemmes, så det vides, hvilken mængde, der skal tilsættes spildevandet eller direkte i enheden via en anden pumpe for at give den krævede testkoncentration.

1.6.1.5. Inokulum

NB: Hvis der anvendes husholdningsspildevand, tjener det ikke noget formål at anvende et inokulum med lav bakteriekoncentration, men der kan bruges aktiveret slam.

Der kan anvendes forskellige former for inokulum.

Her er tre eksempler på et egnet inokulum:

a) Inokulum fra sekundært spildevand

Inokulum laves af sekundært spildevand af god kvalitet fra et rensningsanlæg, der overvejende behandler husholdningsspildevand. Prøven skal holdes under aerobe forhold indtil brugen. Som forberedelse af inokulum filtreres prøven gennem et groft filter, idet de første 200 ml bortkastes. Filtratet holdes under aerobe forhold indtil brugen. Inokulum skal anvendes samme dag, som prøven er taget. Der skal bruges mindst 3 ml til inokulering.

b) Blandet inokulum

Inokulum fra sekundært spildevand se beskrivelsen ovenfor.

Inokulum fra jord:

100 g havejord (fertil, ikke steril) opslæmmes i 1 000 ml chlorfrit drikkevand (jord med et ekstremt højt indhold af ler, sand eller humus er ikke egnet). Efter omrøring henstår suspensionen i 30 minutter for sedimentering. Supernatanten filtreres gennem et groft filterpapir, idet de første 200 ml bortkastes. Beluftning af filtratet begyndes straks og fortsættes indtil brugen. Inokulum skal anvendes samme dag, som prøven er taget.

Inokulum fra overfladevand:

Der tages endnu en del til inokulum fra et mesosaprob overfladevand. Prøven filtreres gennem et groft filterpapir, idet de første 200 ml bortkastes. Filtratet holdes under aerobe forhold indtil brugen. Inokulum skal anvendes samme dag, som prøven er taget.

Lige dele af de tre inokulumprøver blandes godt sammen, og det endelige inokulum tages fra denne blanding. Der skal bruges mindst 3 ml til inokulering.

c) Inokulum af aktiveret slam

Der kan som inokulum bruges en mængde (højest 3 l) aktiveret slam (indhold af suspenderede faste bestanddele på op til 2,5 g/l) udtaget fra luftningstanken i et anlæg, der overvejende behandler husholdningsspildevand.

1.6.2. *Fremgangsmåde*

Testen foretages ved stuetemperatur; temperaturen skal være mellem 18 og 25° C.

Hvis det er hensigtsmæssigt, kan testen foretages ved en lavere temperatur (ned til 10° C): hvis stoffet nedbrydes, kræves der normalt ikke noget yderligere. Hvis stoffet imidlertid ikke nedbrydes, må testen foretages ved en konstant temperatur på mellem 18 og 25° C.

1.6.2.1. *Indkøringsperiode: slamdannelse/stabilisering af enhederne*

Slamdannelses-/stabiliseringsperioden er den periode, hvori koncentrationen af de suspenderede faste bestanddele af det aktiverede slam og enhedernes ydeevne bliver stationær under de anvendte driftsbetingelser.

Indkøringsperioden er den periode, der går fra det tidspunkt, hvor teststoffet første gang tilsættes, indtil det tidspunkt, hvor dets fjernelse har nået et plateau (relativt konstant værdi). Denne periode må højst være på seks uger.

Vurderingsperioden er en tre-ugersperiode, tre uger fra det tidspunkt, hvor teststoffets fjernelse når en relativt konstant og sædvanligvis høj værdi. For stoffer, der viser ringe eller ingen nedbrydning i de første seks uger, regnes vurderingsperioden for de følgende tre uger.

Man indleder med at fylde den eller de enheder, der er nødvendige til én test, med inokulum blandet med tilløb.

Beluftningen (og luftpumpen (E), hvis der er tale om OECD Confirmatory test-enheder) og doseringspumpen (B) sættes derefter i gang.

Tilløb uden teststof skal passere gennem luftningstanken (C) med en hastighed på enten 1 l i timen eller 0,5 l i timen; det giver en middellopholdstid på enten tre eller seks timer.

Beluftningshastigheden reguleres, således at tankens (C) indhold konstant holdes i suspension, medens indholdet af opløst ilt er mindst 2 mg/l.

Man må med egnede midler forhindre skumdannelse. Der må ikke anvendes skumdæmpende midler, der hæmmer det aktiverede slam.

Det slam, der har samlet sig rundt om toppen af luftningstanken (C) (og for OECD Confirmatory test-enheder vedkommende i bunden af sedimenteringstanken (D) og i kredsløbet), skal mindst én gang om dagen føres tilbage til den blandede væske ved afbørstning eller på anden passende vis.

Hvis slammet ikke sedimenterer, kan dets massefylde øges ved tilsætning af 2 ml-portioner af en 5 % ferri-chloridopløsning; dette gentages om fornødent.

Udløbet opsamles i tank (E) eller (F) i 20 til 24 timer, og der udtages en prøve efter grundig blanding. Tanken (E eller F) må omhyggeligt rengøres.

For at kunne overvåge og kontrollere, at processen er effektiv, måles mindst to gange om ugen det kemiske oxygenforbrug (COD) eller indholdet af opløst organisk kulstof (DOC) både i filtratet af det akkumulerede udløb og i det filtrerede indløb (der bruges en membran med en porestørrelse på 0,45 µm, idet de første (ca.) 20 ml af filtratet bortkastes).

COD- eller DOC-reduktionen skulle flade ud, når der er opnået en nogenlunde regelmæssig daglig nedbrydning.

Tørstofindholdet i det aktiverede slam i luftningstanken bestemmes mindst to gange om ugen (i g/l). Man kan benytte enhederne på to forskellige måder: enten bestemmes det aktiverede slams tørstofindhold to gange ugentligt, og hvis det er over 2,5 g/l, bortkastes det overskydende aktiverede slam, eller der fjernes dagligt 500 ml blandet væske fra hver krukke, således at slammet får en middellopholdstid på seks dage.

Når de målte og skønnede parametre (processens effektivitet (med hensyn til COD- eller DOC-fjernelse), slamkoncentration, slamsedimenteringsegenskaber, udløbenes uklarhed osv.) for de to enheder er tilstrækkeligt stabile, kan teststoffet tilsættes indløbet til den ene af enhederne (i henhold til 1.6.2.2).

Det er også muligt at tilsætte teststoffet ved begyndelsen af slamdannelseperioden (1.6.2.1), især hvis slammet tilsættes som inokulum.

1.6.2.2. Test

Arbejdsbetingelserne er de samme som for indkøringsperioden, og der tilsættes så meget stamopløsning (ca. 1 %) af teststoffet til testenhedens indløb, at den ønskede teststofkoncentration (ca. 10 til 20 mg DOC/l eller 40 mg COD/l) i spildevandet opnås. Det kan ske ved, at stamopløsningen blandes i spildevandet dagligt eller ved hjælp af et særskilt pumpe-system. Denne koncentration kan opnås gradvis. Hvis teststoffet ikke har nogen toksiske virkninger på det aktiverede slam, kan også højere koncentrationer testes.

Blindprøveenheden tilføres kun indløb uden tilsatte stoffer. Der udtages passende mængder af udløbene til analyse, og de filtreres gennem membranfiltre (0,45 µm), idet de første (ca.) 20 ml filtrat bortkastes.

De filtrerede prøver skal analyseres samme dag eller konserveres ved en egnet metode, f.eks. ved brug af 0,05 ml af en 1 % mercurichloridopløsning (HgCl₂) for hver 10 ml filtrat eller ved opbevaring ved 2 til 4° C i indtil 24 timer eller under -18° C i en længere periode.

Indkøringsperioden med tilsætning af teststoffet bør ikke være på over seks uger, og vurderingsperioden bør ikke være på under tre uger, dvs. at der foreligger 14 til 20 bestemmelser til beregning af det endelige resultat.

Koblingsmetoden:

Enhederne kobles ved at ombytte 1,5 l blandet væske (inkl. slam) mellem de to enheders luftningskamre en gang om dagen. Hvis der er tale om stærkt adsorberende teststoffer, tages der kun 1,5 l supernatant fra sedimenteringstankene, som hældes i den anden enheds aktivslamtank.

1.6.2.3. Analyse

Der kan foretages to former for analyse for at følge, hvad der sker med stoffet:

DOC og COD

Der foretages dobbeltbestemmelse af DOC-koncentrationerne med kulstofanalysatoren og/eller af COD-værdierne ifølge reference 2.

Specifik analyse:

Teststofkoncentrationerne bestemmes ved en egnet analysemetode. Når det er muligt, foretages der en særlig bestemmelse af det stof, der er adsorberet på slammet.

2. DATA OG VURDERING

2.1. Koblingsmetoden

Når koblingsmetoden anvendes, udregnes den daglige fjernelse, DR, ifølge 1.2.1.

De daglige værdier for fjernelse, DR, korrigeres for den materialeoverførsel, der skyldes transinokuleringen, og benævnes DR_c; der benyttes ligning [2] for en tre timers eller ligning [3] for en seks timers middellopholdstid.

$$DR_c = \frac{8}{7} DR - \frac{100}{7} \quad [2]$$

$$DR_c = \frac{4}{3} DR - \frac{100}{3} \quad [3]$$

Gennemsnittet af DR_c-værdierne udregnes samt standardafvigelsen ifølge ligning [4].

$$S_{DR_c} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{DR}_c - DR_{c_i})^2}{n-1}} \quad [4]$$

hvor:

S_{DR_c} = DR_c-værdiernes standardafvigelse

\overline{DR}_c = gennemsnit af DR_c-værdierne

n = antal bestemmelser.

Outliers i DR_c-værdierne elimineres ved en egnet statistisk fremgangsmåde, f.eks. Nalimov (reference 6), på 95 % sandsynlighedsniveauet, og gennemsnit og standardafvigelse for DR_c-datasættet uden outliers udregnes igen.

Slutresultatet udregnes derefter med ligning [5] som:

$$DR_c = \overline{DR}_c \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} S_{DR_c} \quad [5]$$

hvor:

$t_{n-1;\alpha}$ = tabelværdien af t for n værdipar af E og E_0 og ved en statistisk konfidens på P ($P = 1 - \alpha$), hvor P sættes til 95 % (reference 1).

Resultatet angives som gennemsnittet med tolerancer på 95 % sandsynlighedsniveauet, den tilsvarende standardafvigelse og antallet af data i DR_c-datasættet uden outliers samt antallet af outliers, f.eks.:

DR_c = 98,6 ± 2,3 % DOC-fjernelse

s = 4,65 % DOC-fjernelse

n = 18

x = antal outliers.

2.2. Metode uden kobling

Enhedernes ydeevne kan kontrolleres på følgende måde:

$$\text{procent fjernelse af COD eller DOC} = \frac{\text{COD eller DOC i spildevand} - \text{COD eller DOC i afløb}}{\text{COD eller DOC i spildevand}} \times 100$$

Den daglige fjernelse kan afbildes grafisk, således at det fremgår, om der er nogen tendenser til f.eks. tilvænnning.

2.2.1. Benyttelse af COD/DOC-bestemmelser

Den daglige procent fjernelse, % DR, udregnes ifølge 1.2.1.

Gennemsnittet af DR-værdierne udregnes samt standardafvigelsen ifølge:

$$S_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{DR} - DR_i)^2}{n-1}} \quad [6]$$

hvor:

S_{DR} = DR_i-værdiernes standardafvigelse

\overline{DR} = gennemsnit i DR_i-værdierne

n = antal bestemmelser,

Outliers i DR-værdierne elimineres ved en egnet statistisk fremgangsmåde, f.eks. Nalimov (reference 6), på 95 % sandsynlighedsniveauet, og gennemsnit og standardafvigelse for DR-datasættet uden outliers udregnes igen.

Slutresultatet udregnes derefter med ligning [7] som:

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} S_{DR} \quad [7]$$

hvor:

$t_{n-1;\alpha}$ = tabelværdi af t for n værdipar af E og E_0 og ved en statistisk konfidens på P ($P = 1 - \alpha$), hvor P sættes til 95 % (reference 1).

Resultatet angives som gennemsnittet med tolerancer på 95 % sandsynlighedsniveauet, den tilsvarende standardafvigelse og antallet af data i DR-datasættet uden outliers samt antallet af outliers, f.eks.:

DR = (98,6 ± 2,3) % DOC-fjernelse

s = 4,65 % DOC-fjernelse

n = 18

x = antal outliers.

2.2.2. Benyttelse af specifik analyse

Den procentdel teststof, der elimineres fra den vandige fase (R_w), udregnes ifølge 1.2.2.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- det i tillæg III gengivne skema, der viser arbejdsbetingelserne for testen
- det valgte apparatur (OECD Confirmatory tester eller porous pot)
- den valgte arbejdsmetode: koblingsmetode eller ej
- form for spildevand: syntetisk spildevand eller husholdningsspildevand. Hvis der er tale om husholdningsspildevand anføres dato og sted for prøveudtagning
- anvendt inokulum med dato og sted for prøvens udtagning
- angivelse af analysemetoden, hvis der er foretaget specifikke analyser, og en beskrivelse af den
- afbildning af COD- eller DOC-fjernelse mod tiden, herunder indkørings- og vurderingsperiode
- analytisk genfindning af teststoffet som COD eller DOC i stamopløsningen
- afbildning af den procentvise fjernelse af teststof fra den vandige fase mod tiden (indkøringsperiode og vurderingsperiode), hvis der er foretaget specifikke analyser
- den gennemsnitlige fjernelse af DOC, COD eller teststof samt standardafvigelse udregnes af resultaterne fra vurderingsperioden, dvs. når der er en stabil fjernelse af teststof
- afbildning af aktivslamkoncentration mod tiden
- eventuelle bemærkninger vedrørende det aktiverede slam (bortkastet overskydende slam, forekomst af klumpdannelse $FeCl_3$ osv.)
- teststofkoncentration benyttet ved testen
- eventuelle resultater af analyser af slammet
- alle oplysninger og forsøgsresultater vedrørende teststoffet og referencestoffer, hvis sådanne er anvendt
- videnskabelige grunde til eventuelle ændringer af fremgangsmåden.

3.2. Fortolkning af Resultaterne

Hvis den procent teststof, der fjernes fra den vandige fase, er lav, kan de skyldes, at teststoffet hæmmer mikroorganismer. Også lysis og tab af slam, som giver uklar supernatant, samt nedsat effektivitet med hensyn til fjernelse af COD (eller DOC) kan afsløre dette.

Undertiden kan fysisk-kemisk adsorption spille en rolle. Forskelle mellem biologisk virkning på molekylet og fysisk-kemisk adsorption kan afsløres ved analyse af slammet efter passende desorption.

Der kræves yderligere tests, hvis der skal skelnes mellem bionedbrydning (eller delvis bionedbrydning) og adsorption.

Det kan gøres på flere forskellige måder, men den mest overbevisende er brug af supernatanten som inokulum i en basis-sæt test (helst respirometrisk test).

Hvis det observeres, at den procentvise fjernelse af DOC eller COD er høj, skyldes dette bionedbrydning, hvorimod der ved lave fjernelsesprocenter ikke kan skelnes mellem bionedbrydning og eliminering. Som eksempel kan nævnes, at hvis et opløseligt stof udviser en høj adsorptionskonstant på 98 %, og der bortkastes 10 % overskydende slam pr. dag, er en eliminering på op til 40 % mulig; hvis der bortkastes 30 % overskydende slam, kan eliminering på grund af adsorption på og fjernelse sammen med overskydende slam komme op på 65 % (reference 4).

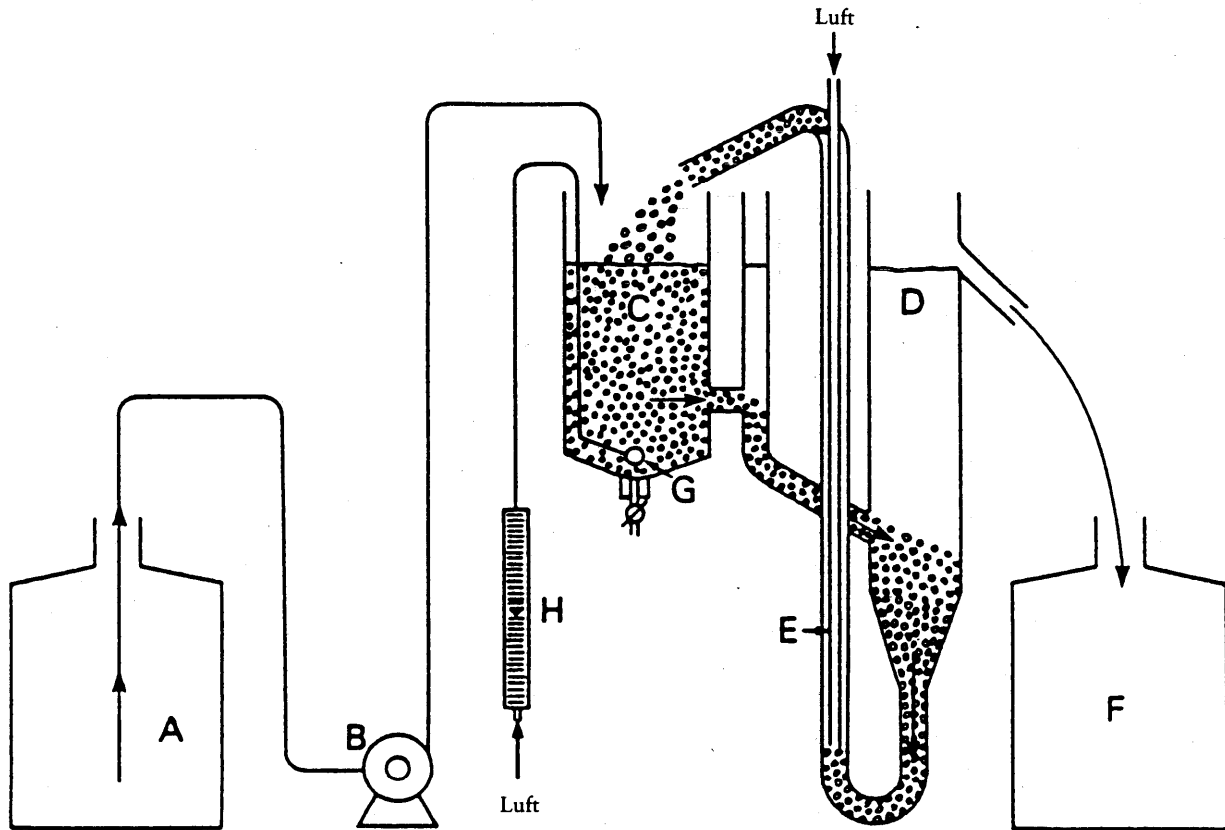
Når der benyttes specifik analyse, må man være opmærksom på forholdet mellem stoffets struktur og den benyttede specifikke analyse. I dette tilfælde kan det observerede fænomen ikke fortolkes som en mineralisering af stoffet.

4. REFERENCER

- (1) OECD, Paris, *Test Guideline 303 A*, Decision of the Council C(81) 30 Final.
- (2) Bilag V C9 Nedbrydningstest — kemisk oxygenforbrug Kommissionens direktive 84/449/EØF, *De Europæiske Fællesskabers Tidende*, nr. L 251 af 19. 9. 1984.
- (3) Painter, H. A. and King, E. F., *WRC Porous-Pot method for assessing biodegradability*. Technical Report TR70. June 1978, Water Research Center, UK.
- (4) Wierich, P. and Gerike, P., »The Fate of Soluble, Recalcitrant, and Adsorbing Compounds in Activated Sludge Plants« — *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol 5, no 2, June 1981, p. 161, 171.
- (5) Rådets direktiv 82/242/EØF og 82/243/EØF (*De Europæiske Fællesskabers Tidende* nr. L 109 af 22. 4. 1982) om ændring af direktiv 73/404/EØF og 73/405/EØF: vaske- og rengøringsmidlers bionedbrydelighed (*De Europæiske Fællesskabers Tidende* nr. L 347 af 17. 12. 1973).
- (6) H. Streuli, Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreissertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fesenius-Zeitschrift für Analytische Chemie* 303 (1980) 406—408.

Tillæg 1

Figur 1



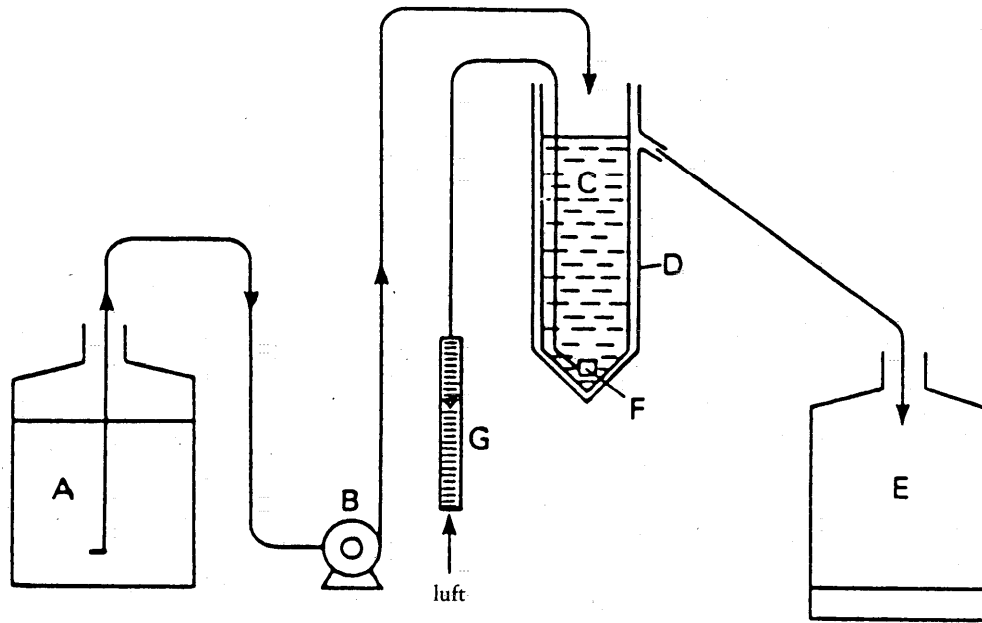
A = holdetank
 B = doseringspumpe
 C = luftningstank (kapacitet 3 l)
 D = sedimenteringstank

E = slampumpe
 F = opsamlingsstank
 G = luftningsklods
 H = flowmeter (valgfrit)

Tillæg 2

Figur 1

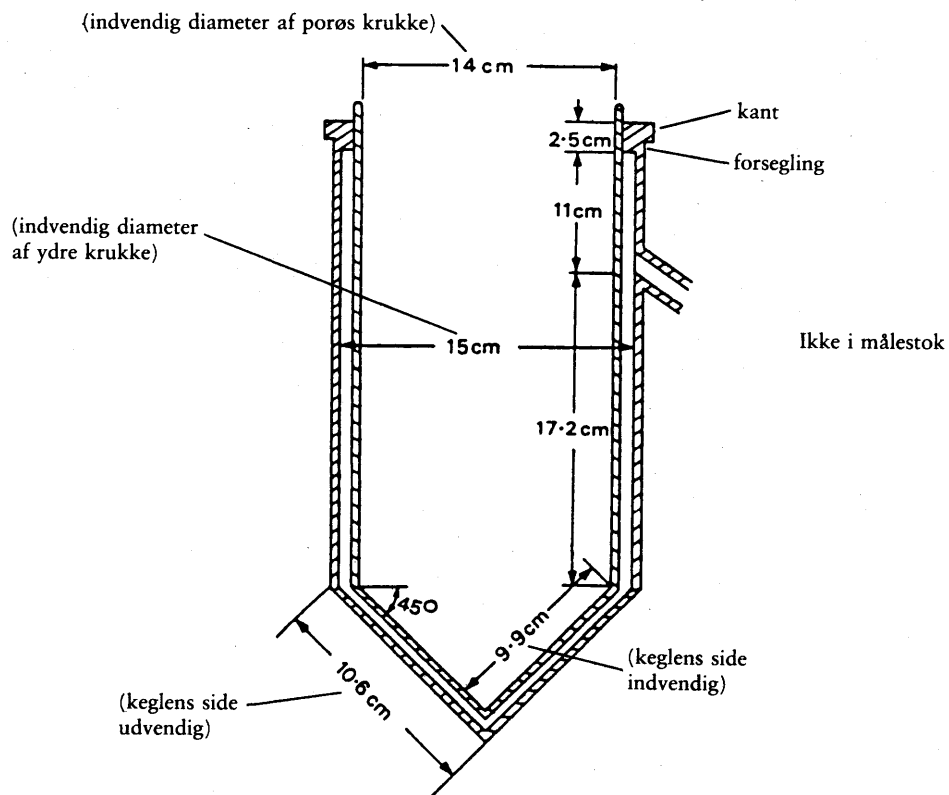
Udstyr til bedømmelse af bionedbrydelighed



- | | |
|-----------------------------|--------------------------|
| A = holdetank | E = opsamlingskrukke |
| B = doseringspumpe | F = luftningsklods |
| C = porøs luftningsbeholder | G = rotameter (valgfrit) |
| D = ydre vandtæt beholder | |

Figur 2

Tre-liters porøs luftningskrukke



Tillæg 3

Arbejdsbetingelser for simulationstest for aktiveret slam

Der sættes et kryds i hver gruppe

*Apparatur*OECD Confirmatory
Porous Pot

*Arbejdsmetode*enkelt enhed
koblede enheder
ikke-koblede enheder

*Transinokulering*ingen
aktiveret slam
supernatant

*Middelopholdstid*tre timer
seks timer

*Basisnæringsstof*husholdningsspildevand
syntetisk spildevand

*Inokulum*sekundært spildevand
blandet inokulum
aktiveret slam

*Tilsætning af teststof*fra starten
trinvis forøgelse
efter slamdannelse

*Analyse*specifik
COD
DOC

BIOLOGISK NEDBRYDNING

AKTIVERET SLAM — RESPIRATIONSHÆMNINGSTEST

1. METODE

1.1. Indledning

Den beskrevne metode vurderer virkningen af et teststof på mikroorganismer ved måling af respirationshastigheden under definerede betingelser ved forskellige koncentrationer af teststoffet.

Formålet med metoden er at give en hurtig screening-metode til identifikation af stoffer, der kan påvirke et aerobt mikrobielt rensningsanlæg uheldigt, og at indikere passende ikke-hæmmende koncentrationer af teststoffer til anvendelse i bionedbrydelighedstests.

Inden den endelige test kan der udføres en forprøve. Den giver oplysninger om det koncentrationsinterval, som skal anvendes i hovedtesten.

I testen indgår to kontroltests, én i begyndelsen og én i slutningen af testrækken. Desuden bør hvert parti aktiveret slam også kontrolleres ved brug af et referencestof.

Metoden kan lettest benyttes for stoffer, der på grund af deres opløselighed i vand og ringe flygtighed sandsynligvis vil forblive i vandet.

Det kan for stoffer med begrænset opløselighed i testmediet vise sig umuligt at bestemme EC_{50} .

Resultater, der er baseret på oxygenoptagelse, kan føre til fejlslutninger, hvis teststoffet har tendens til at afkoble oxidativ phosphorylering.

Det er nyttigt at have følgende oplysninger, når testen skal foretages:

- vandopløselighed
- damptryk
- strukturformel
- teststoffets renhed.

Anbefaling:

Aktiveret slam kan indeholde potentielt patogene organismer og skal håndteres med forsigtighed.

1.2. Definitioner og enheder

Respirationshastigheden er oxygenforbruget hos mikroorganismer i aerobt spildevandsslam og udtrykkes almindeligvis i mg O_2 pr. mg slam pr. time.

Til beregning af et teststofs hæmmende virkning i en bestemt koncentration udtrykkes respirationshastigheden som en procentdel af gennemsnittet af to kontrolrespirationshastigheder:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{RC_1 + RC_2}\right) \times 100 = \% \text{ hæmning}$$

hvor:

- R_s = oxygenforbruget ved testkoncentrationen af teststoffet,
- RC_1 = oxygenforbruget, kontrol 1,
- RC_2 = oxygenforbruget, kontrol 2.

I forbindelse med denne metode er EC_{50} den koncentration af teststoffet, hvorved respirationen er 50 % af den, som kontroltesten viser under de i denne metode beskrevne betingelser.

1.3. Referencestoffer

Det anbefales at bruge 3,5-dichlorphenol, som vides at hæmme respiration, som referencestof og at teste det for EC_{50} for hvert parti aktiveret slam for at kontrollere, at slammets følsomhed ikke er unormal.

1.4. Testmetodens princip

Respirationshastigheden i aktiveret slam tilført en standardmængde syntetisk spildevand måles efter en kontakttid på 30 minutter og/eller tre timer. Respirationshastigheden i det samme aktiverede slam ved forskellige koncentrationer af teststoffet under i øvrigt identiske betingelser måles også. Teststoffets hæmmende virkning ved en bestemt koncentration udtrykkes som en procentdel af middelrespirationshastigheden i to kontroltests. Der beregnes en EC_{50} -værdi ud fra bestemmelser ved forskellige koncentrationer.

1.5. Kvalitetskriterier

Testresultaterne er gyldige, hvis:

- respirationshastigheden i de to kontroltests ligger inden for 15% af hinanden
- EC_{50} (30 minutter og/eller tre timer) for 3,5-dichlorphenol ligger inden for det accepterede område på 5 til 30 mg/l.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

1.6.1. Reagenser

1.6.1.1. Opløsninger af teststoffet

Teststofopløsningerne frisklaves ved undersøgelsens indledning ved brug af en stamopløsning. En stamopløsningskoncentration på 0,5 g/l er egnet, hvis nedenstående anbefalede fremgangsmåde følges.

1.6.1.2. Opløsning af kontrolstoffet

Der fremstilles som eksempel en 3,5-dichlorphenolopløsning ved at opløse 0,5 g 3,5-dichlorphenol i 10 ml 1 M NaOH og fortynde med destilleret vand til ca. 30 ml; derefter tilsættes under omrøring 0,5 M H_2SO_4 til det punkt, hvor udfældning begynder — der kræves ca. 8 ml 0,5 M H_2SO_4 — og endelig fortyndes blandingen med destilleret vand til 1 l. pH skulle derefter være omkring 7 til 8.

1.6.1.3. Syntetisk spildevand

Der kan tillaves syntetisk spildevand ved opløsning af følgende mængder stof i 1 l vand:

- 16 g pepton
- 11 g kødekstrakt
- 3 g urea
- 0,7 g NaCl
- 0,4 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
- 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 2,8 g K_2HPO_4 .

Note 1: Dette syntetiske spildevand er 100 gange så koncentreret som det, der er beskrevet i OECD Technical Report »Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents« af 11. juni 1976 med tilsætning af dikaliumhydrogenphosphat.

Note 2: Hvis det fremstillede medium ikke anvendes straks, skal det opbevares i mørke ved 0 til 4° C, dog ikke længere end en uge og under forhold som ikke giver anledning til ændring i sammensætningen.

Medium kan også steriliseres forud for oplagringen, eller der kan tilsættes pepton og kødekstrakt kort tid før testen udføres. Umiddelbart før brug blandes omhyggeligt og pH justeres.

1.6.2. Apparatur

Måleapparatur: Det er ikke afgørende, hvordan apparaturet nærmere er udformet. Der må imidlertid ikke være luftmelletrum mellem væske og prop, og sonden skal slutte tæt til kolbens hals.

Der kræves normalt laboratorieudstyr og især følgende:

- måleapparatur
- beluftningsapparatur
- pH-elektrode og -måleudstyr
- O_2 -elektrode.

1.6.3. *Forberedelse af inokulum*

Som mikrobielt inokulum til testen anvendes aktiveret slam fra et rensningsanlæg, der overvejende behandler husholdningsspildevand.

På laboratoriet kan grovere praktikler om nødvendigt fjernes ved kort henstand, f.eks. 15 minutter, efterfulgt af dekantering af det øverste lag med finere slampartikler. Alternativt kan slammet anvendes efter blanding i få sekunder i blender. Hertil kommer, at slammet bør vaskes med vand (fra hanen) eller en isotonisk opløsning, hvis hæmmende stoffer kan forudses at være til stede. Efter centrifugering dekanteres supernatanten fra, hvilket gentages tre gange.

En mindre mængde af slammet afvejes og tørres. Herudfra kan beregnes den mængde af vådt slam, som skal suspenderes i vand for at opnå et aktivt slam med et indhold af faste bestanddele suspenderet i en blandet væske på 2 til 4 g/l. Dette svarer til en koncentration på 0,8 til 1,6 g/l i testmediet, hvis den nedenfor anbefalede procedure følges.

Hvis slammet ikke kan anvendes den dag, det er indsamlet, tilsættes der 50 ml syntetisk spildevand til hver liter aktiveret slam, der er fremstillet som ovenfor beskrevet; slammet beluftes derefter natten over ved $20 \pm 2^\circ \text{C}$. Det holdes derefter beluftet, indtil det anvendes den følgende dag. Inden anvendelsen kontrolleres pH, som om nødvendigt bufferes til pH 6 til 8. De faste bestanddele, der er suspenderet i den blandede væske, bestemmes som beskrevet i foregående afsnit.

Hvis der er behov for at anvende det samme parti slam de efterfølgende dage (højest fire dage), tilsættes yderligere 50 ml syntetisk spildevand ved hver arbejdsdags slutning.

1.6.4. *Fremgangsmåde*

Varighed/kontaktid:	30 minutter og/eller tre timer under beluftning
Vand:	Drikkevand (om nødvendigt befriet for chlor)
Lufttilførsel:	Ren, oliefri luft. Luftgennemstrøming 0,5 til 1,0 l/min.
Måleapparat:	Fladbundet kolbe som f.eks. en BOD-kolbe (se figur 1)
Oxygenmåler:	Oxygenelektrode med tilhørende skriver
Næringsopløsning:	Syntetisk spildevand (se ovenfor)
Teststof:	Testopløsningen laves frisk ved testens begyndelse
Referencestof:	F.eks. 3,5-dichlorphenol (mindst tre koncentrationer)
Kontroltest:	Inokuleret prøve uden teststof
Temperatur:	$20 \pm 2^\circ \text{C}$.

Nedenfor gives forslag til en eksperimentel procedure, der kan følges for både testen og referencestoffet i tre-timers kontaktperioden:

Der anvendes flere beholdere (f.eks. et-liters bægerglas).

Der benyttes mindst fem koncentrationer med et fast koncentrationsforhold på helst ikke over 3,2.

På tidspunktet »0« fortyndes 16 ml af det syntetiske spildevand med vand til 300 ml. Der tilsættes 200 ml af det mikrobielle inokulum, og hele blandingen (500 ml) hældes i en første beholder (første kontrol C_1).

Testbeholderen skal gennemluftes kontinuerligt for at sikre, at opløst ilt (O_2) ikke falder under 2,5 mg/l, og at iltkoncentrationen er i størrelsesorden 6,5 mg/l umiddelbart før målingen af respirationshastigheden.

På tidspunkt »15 minutter« (15 minutter er et vilkårligt, men bekvemt interval) gentages ovenstående proces, bortset fra at der tilsættes 100 ml teststofstamopløsning til de 16 ml syntetisk spildevand, før der tilsættes vand til 300 ml og mikrobielt inokulum til i alt 500 ml. Denne blanding hældes dernæst i et andet bægerglas og beluftes som omhandlet ovenfor. Denne proces gentages med 15 minutters intervaller med forskellige mængder teststofstamopløsning, således at der bliver en række beholdere med forskellige koncentrationer af teststoffet. Til slut fremstilles en anden kontrol (C_2).

Efter tre timers forløb måles pH, og efter god blanding hældes en del af den første beholders indhold over i måleapparatet, og respirationshastigheden måles over en periode på indtil ti minutter.

Denne bestemmelse gentages for hver beholders indhold med 15 minutters intervaller, således at kontakttiden for hver beholder bliver tre timer.

Referencestoffet testes med hver parti mikrobielt inokulum på samme måde.

Et andet system (f.eks. mere end én oxygenmåler) vil være nødvendigt, når der skal foretages målinger efter 30 minutters kontakt.

Hvis der kræves måling af det kemiske oxygenforbrug, må der fremstilles andre beholdere, som indeholder teststof, syntetisk spildevand og vand, men ikke aktiveret slam.

Oxygenforbruget måles og registreres efter en beluftningstid på 30 minutter og/eller tre timer (kontakttid).

2. DATA OG VURDERING

Respirationshastigheden beregnes ud fra skriverkurven som $\text{mg O}_2/\text{l} \times \text{h}$ mellem ca. 6,5 $\text{mg O}_2/\text{l}$ og 2,5 $\text{mg O}_2/\text{l}$, eller over en ti minutters periode, hvis respirationshastigheden er lav. Den del af respirationskurven, som respirationshastigheden måles over, skal være lineær.

Hvis respirationshastighederne i de to kontroltests ikke ligger inden for 15% af hinanden, eller hvis referencestoffets EC_{50} (30 minutter og/eller tre timer) ikke ligger inden for det accepterede område (5 til 30 mg/l for 3,5-dichlorphenol), er testen ugyldig og må gentages.

Hæmningsprocenten beregnes ved hver testkoncentration (se 1.2). Hæmningsprocenten aftegnes mod koncentration på semilogaritmisk papir (eller probit), og der udledes en EC_{50} -værdi.

95%-konfidensgrænserne for EC_{50} -værdierne kan bestemmes ved hjælp af standardprocedurer.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- teststof: data for kemisk identifikation
- testsystem: kilde, koncentration og eventuel forbehandling af det aktiverede slam
- testbetingelser:
 - reaktionsblandingsens pH før respirationsmåling
 - testtemperatur
 - testens varighed
 - referencestof og dets målte EC_{50}
 - eventuel abiotisk oxygenoptagelse
- resultater:
 - alle målte data
 - hæmningskurve og metode til beregning af EC_{50}
 - EC_{50} og om muligt 95% konfidensgrænser, EC_{20} og EC_{80}
 - alle observationer og eventuelle afgivelser fra denne testmetode, som kan have haft indflydelse på resultatet.

3.2. Fortolkning af data

EC_{50} værdien må kun betragtes som vejledende for teststoffets sandsynlige toksicitet for enten spildevandsbehandling med aktiveret slam eller mikroorganismer i spildevand, da de komplekse vekselvirkninger, der forekommer i miljøet, ikke kan simuleres nøjagtigt i en laboratorietest. Hertil kommer at teststoffer, som har en hæmmende effekt på ammoniak oxidation også kan give anledning til atypiske hæmningskurver. Sådanne kurver må fortolkes med forsigtighed.

4. **REFERENCER**

- (1) International Standard ISO/8192 — 1986.
 - (2) Broecker, B. and Zahn, R., *Water Research* 11, 165 (1977).
 - (3) Brown, D., Hitz, H. R. and Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 245 (1981).
 - (4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Recommended Method No. 103*, også beskrevet af:
 - (5) B. Robra, *Wasser/Abwasser* 117, 80 (1976).
 - (6) W. Schefer, *Textilveredlung* 6, 247 (1977).
 - (7) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 209*. Decision of the Council C(81) 30 Final.
-

BIOLOGISK NEDBRYDNING

MODIFICERET SCAS-TEST

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Formålet med denne metode er at bedømme den potentielle fuldstændige bionedbrydelighed af vandopløselige, ikke-flygtige organiske stoffer, når disse udsættes for ret høje koncentrationer af mikroorganismer over et længere tidsrum. I dette tidsrum holdes mikroorganismene i live ved en daglig tilførsel af næring bestående af bundfældet spildevand. (I forbindelse med weekenden kan spildevandet opbevares ved 4° C, eller det syntetiske spildevand til OECD's confirmatory test kan anvendes.)

Der kan finde fysisk-kemisk adsorption sted på de suspendede faste stoffer, og der skal tages hensyn hertil ved fortolkningen af resultaterne (jf. 3.2).

På grund af den flydende fases lange opholdstid (36 timer), og da der med mellemrum tilføres næringsstoffer, simulerer testen ikke de normale vilkår i et spildevandsanlæg. De resultater, der er opnået med forskellige teststoffer, viser, at denne metode har en høj bionedbrydningsevne.

De betingelser, der skabes i denne metode, letter i høj grad selektion og/eller adaptation af mikroorganismer, der er i stand til at nedbryde teststoffet. (Denne fremgangsmåde kan ligeledes anvendes til at fremstille akklimatiserede inocula til brug i andre tests.)

I denne test vurderes teststoffernes fuldstændige bionedbrydelighed ved måling af koncentrationen af opløst organisk kulstof (DOC). Det bør foretrækkes at bestemme koncentrationen af opløst organisk kulstof efter oprensning af den sure opløsning snarere end som forskellen mellem total C og uorganisk C.

Ved samtidig brug af en specifik analysemetode kan teststoffets primære nedbrydning (nedbrydning af en oprindelige kemiske struktur) vurderes.

Denne metode kan kun anvendes på organiske teststoffer, som ved den i analysen anvendte koncentration:

- er opløselige i vand (mindst 20 mg opløst organisk kulstof/l)
- har et ubetydeligt damptryk
- ikke er hæmmende overfor bakterier
- ikke adsorberes væsentligt i testsystemet
- ikke går tabt ved, at testopløsningen skummer.

Teststoffets indhold af organisk kulstof skal være bekendt.

Oplysninger om de relative mængder af teststoffets hovedkomponenter vil være nyttige for fortolkningen af de opnåede resultater, specielt i de tilfælde, hvor resultaterne er lave eller marginale.

Oplysninger om stoffets toksicitet for mikroorganismer kan være nyttige for fortolkningen for lidet signifikante resultater og for valg af en egnet testkoncentration.

1.2. Definitioner og enheder

C_t = koncentration af organisk kulstof i teststoffet, til stede i eller tilsat det bundfældende spildevand ved begyndelsen af beluftsperioden (mg/l)

C_t = koncentrationen af opløst organisk kulstof i supernatanten ved afslutningen af beluftsperioden (mg/l)

C_c = koncentrationen af opløst organisk kulstof i kontrollens supernatant ved afslutningen af beluftsperioden (mg/l).

Bionedbrydeligheden defineres i denne test som det organiske kulstofs forsvinden. Bionedbrydningen kan udtrykkes som:

1. Den procentvise forsvinden D_{da} af den mængde af stoffet, der tilføres dagligt:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \quad [1]$$

hvor:

D_{da} = nedbrydning/daglig tilførsel.

2. Den procentvise forsvinden D_{ssd} af den mængde stof, der er til stede ved hver dags begyndelse:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \quad [2(a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2(b)]$$

hvor:

D_{ssd} = nedbrydning/stof ved dagens begyndelse.

Indekserne i og $(i + 1)$ henviser til testdagen; ligning [2(a)] bør anvendes, hvis spildevandets indhold af opløst organisk kulstof svinger fra dag til dag, medens ligning [2(b)] kan anvendes, når mængden af opløst organisk kulstof er forholdsvis konstant fra dag til dag.

1.3. Referencestoffer

I visse tilfælde kan referencestoffer være nyttige ved undersøgelsen af et nyt stof. Der kan imidlertid ikke anbefales noget bestemt referencestof.

Der angives oplysninger om flere forskellige stoffer, der er evalueret i ringtests (jf. tillæg 1), først og fremmest for at testmetoden af og til kan kalibreres, men også for at resultaterne kan sammenlignes, hvis der anvendes en anden metode.

1.4. Testmetodens princip

Aktiveret slam fra et biologisk rensningsanlæg placeres i en semi-kontinuerlig aktiveret slamenhed (semi-continuous activated sludge — SCAS). Teststoffet og bundfældet husholdningsspildevand tilføres, og blandingen beluftes i 23 timer. Beluftningen indstilles derefter, slammet gives tid til at bundfælde sig, og supernatant væsken fjernes.

Det tilbageblevne slam i beluftningskammeret iblandes dernæst en yderligere mængde af teststoffet op spildevandet, hvorefter cyklusen begynder forfra.

Bionedbrydning konstateres ved at bestemme indholdet af opløst organisk kulstof i supernatant væsken. Dette resultat sammenlignes med resultatet af analysen af væsken fra en kontrolenhed, som kun er tilført bundfældet spildevand.

Såfremt der anvendes en specifik analysemetode, kan ændringer i koncentrationen af det oprindelige stof som følge af bionedbrydningen måles (primær bionedbrydelighed).

1.5. Kvalitetskriterier

Denne metodes reproducerbarhed, baseret på fjernelse af opløst organisk kulstof, er endnu ikke fastslået. (For så vidt angår primær bionedbrydning, er der opnået meget nøjagtige data for let nedbrydelige stoffer).

Metodens følsomhed afhænger i vid udstrækning af variabiliteten i blindprøven og i mindre grad af den nøjagtighed, hvormed indholdet af opløst organisk kulstof kan bestemmes, eller af væskens indhold af teststof ved påbegyndelsen af hver enkelt cyklus.

1.6. Beskrivelse af testproceduren

1.6.1. Forberedelse

Et tilstrækkeligt antal rene beluftningsenheder (i stedet kan den oprindelige 1,5 l SCAS-prøveenhed anvendes) og lufttilførselsslanger (figur 1) for hvert enkelt teststof og til kontrollen klargøres. Den komprimerede luft, der tilføres testenhederne, renses med et vatfilter og bør være fri for organisk kulstof og være forudmættet med vand, så fordampningstab reduceres.

Fra et aktiveret slam anlæg der primært behandler husholdningsspildevand, tages en prøve af blandet væske, indeholdende 1 til 4 g suspenderet fast stof pr. liter.

Til hver beluftningsenhed kræves ca. 150 ml af den blandede væske.

Stamopløsninger af teststoffet tilberedes i destilleret vand. Den normalt krævede koncentration er 400 mg organisk kulstof pr. liter hvilket giver en koncentration af teststoffet på 20 mg/l ved påbegyndelsen af hver beluftningscyklus, såfremt der ikke finder bionedbrydning sted.

Der kan anvendes højere koncentrationer, hvis toksiciteten over for mikroorganismene tillader det.

Slamopløsningernes indhold af organisk kulstof måles.

1.6.2. *Testbetingelser*

Testen bør foretages ved 20 til 25° C.

Der anvendes en høj koncentration af aerobe mikroorganismer (fra 1 til 4 g suspenderet fast stof pr. liter), og den effektive opholdstid er 36 timer. Det kulstofholdige materiale i det tilførte spildevand iltes grundigt, sædvanligvis inden otte timer efter påbegyndelsen af hver beluftningscyklus. Derefter respirerer slammet endogent i resten af beluftningsperioden, hvorunder det eneste tilgængelige substrat er teststoffet, medmindre også dette metaboliseres hurtigt. Disse forhold, kombineret med daglig genpodning af prøven når husholdningsspildevand anvendes som medium, giver uhyre gunstige betingelser for såvel akklimatisering som høj grad af bionedbrydning.

1.6.3. *Gennemførelsen af testen*

Der fremstilles en prøve af blandet væske fra en laboratorieenhed, der overvejende behandler husholdningsspildevand eller fra et egnet aktiveret slamanlæg, og prøven opbevares under aerobe betingelser indtil anvendelsen i laboratoriet. Hver beluftningsenhed samt kontrolenheden påfyldes 150 ml (hvis den oprindelige SCAS-test anvendes, multipliceres de anførte volumener med 10) blandet væske, og beluftningen påbegyndes. Efter 23 timers forløb indstilles beluftningen, og slammet bundfældes i 45 minutter. Hanen på hver kolbe åbnes successivt, og der udtages 100 ml af supernatant væsken. Der klargøres en prøve bundfældet husholdningsspildevand umiddelbart før brug, og 100 ml heraf tilsættes det tilbageblevne slam i hver beluftningsenhed. Beluftningen påbegyndes på ny. På dette stadium tilsættes intet teststof. Enhederne tilsættes dagligt husholdningsspildevand, men kun indtil det tidspunkt, hvor bundfældningen resulterer i en klar supernatant væske. Dette tager sædvanligvis op til to uger, hvorefter det opløste organiske kulstof i supernatant væsken ved afslutningen af hver beluftningscyklus nærmer sig en konstant værdi.

Ved afslutningen af dette tidsrum blandes de forskellige bundfældede slamprøver, og 50 ml af denne blandede slamprøve tilsættes til hver enhed.

Der tilsættes 95 ml bundfældet spildevand og 5 ml vand til kontrolenhederne, og 95 ml bundfældet spildevand plus 5 ml af den pågældende stamopløsning af teststoffet (400 mg/l) til testenhederne. Beluftningen påbegyndes atter og fortsættes i 23 timer. Slammet bundfældes i 45 minutter, og supernatant væsken fjernes og analyseres for opløst organisk kulstof.

Ovenstående påfyldnings- og aftapningsprocedure gentages dagligt under hele testens forløb.

Inden bundfældningen kan det være nødvendigt at rense enhedernes vægge for at forhindre akkumulering af faste stoffer over væskens niveau. For at undgå krydskontaminering anvendes der en separat skraber eller børste for hver enkelt enhed.

Ideelt set bør indholdet af opløst organisk kulstof i supernatant væskerne bestemmes dagligt, selv om mindre hyppige analyser kan tillades. Inden analysen filtreres væskerne gennem vaskede membranfilter med en porestørrelse på 0,45 µm, eller væskerne centrifugeres. Membranfilter er egnede, hvis der er sikkerhed for, at de hverken afgiver kulstof eller adsorberer stoffet under filtreringen. Prøvens temperatur må ikke overstige 40° C, så længe den er i centrifugen.

Testens varighed er ubestemt for stoffer, der udviser ringe eller ingen bionedbrydning. Erfaringerne viser dog, at den generelt bør vare mindst tolv uger, men ikke længere end 26 uger.

2. DATA OG EVALUERING

Værdierne for indholdet af opløst kulstof i supernatant væskerne i testenhederne og i kontrolenhederne afbildes mod tiden i et koordinatsystem.

Efterhånden som nedbrydningen skrider frem, vil niveauet i testenheden nærme sig niveauet i kontrolenheden. Når forskellen mellem de to niveauer er konstant i tre på hinanden følgende målinger, gennemføres der et tilstrækkeligt antal yderligere målinger til en statistisk behandling af dataene, og den procentvise bionedbrydning af teststoffet beregnes (D_{da} eller D_{ssd} , jf. 1.2).

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- fuldstændige oplysninger om spildevandets art, om hvilken type enhed der er anvendt samt om forsøgsresultaterne vedrørende teststoffet, referencestoffet, hvis et sådan er anvendt, og blindprøven
- temperatur
- kurve for det organiske kulstofs forsvinden, med beskrivelse af beregningsmetode (jf. 1.2)
- dato og sted for prøveudtagning af aktiveret slam og spildevand, status vedrørende adaptation, koncentration osv.
- videnskabelige grunde til eventuelle ændringer i testproceduren
- underskrift og dato.

3.2. Fortolkning af resultaterne

Eftersom det stof, der kan testes med denne metode, ikke vil være let bionedbrydeligt, vil enhver forsvinden af opløst organisk kulstof, som udelukkende skyldes bionedbrydning, normalt forløbe gradvis over dage eller uger, undtagen i sådanne tilfælde, hvor akklimatiseringen er pludselig, hvilket fremgår af en abrupt forsvinden efter nogle uger.

Fysisk-kemisk adsorption kan imidlertid nogle gange spille en betydelig rolle. Dette er tilfældet, når der ved begyndelsen indtræder en fuldstændig eller delvis forsvinden af det tilsatte opløste organiske kulstof. Hvad der derefter sker, afhænger af forskellige faktorer, såsom adsorptionsgraden og koncentrationen af suspenderet fast stof i det bortkastede spildevand. Forskellen mellem koncentrationen af opløst organisk kulstof i kontrol- og testenhedernes supernatant væsker øges sædvanligvis gradvis fra den først indtrufne værdi, og denne forskel forbliver dernæst på den nye værdi under resten af forsøget, medmindre der finder akklimatisering sted.

Når der skal skelnes mellem bionedbrydning (eller delvis bionedbrydning) og adsorption, er yderligere analyser påkrævet. Dette kan gøres på flere forskellige måder, men den mest pålidelige metode er at anvende supernatant væsken, eller slam, som podestof i en basissæt test (helst en respirometrisk test).

Teststoffet, der resulterer i omfattende, ikke adsorptiv forsvinden af opløst organisk kulstof, bør i denne test betragtes som potentielt bionedbrydeligt. Delvis ikke adsorptiv forsvinden tyder på, at stoffet i hvert fald er bionedbrydeligt til en vis grad.

Ringe eller ingen forsvinden af opløst organisk kulstof kan skyldes teststoffets hæmning af mikroorganismene. Dette kan ligeledes afsløres af lysis og tab af slam, hvilket giver uklare supernatant væsker. Testen bør i så fald gentages med anvendelse af en lavere koncentration af teststoffet.

Anvendelsen af en specifik analysemetode eller C-14-mærket teststof kan give større følsomhed. Anvendes der et C-14-teststof, vil genfindning af $^{14}\text{CO}_2$ bekræfte, at der fundet bionedbrydning sted.

Såfremt der ligledes angives resultater for primær bionedbrydning, bør der om muligt gives en forklaring på den forandring i den kemiske struktur, der medfører, at det oprindelige teststof ikke kan påvises.

Valideringen af analysemetoden skal anføres sammen med værdierne for blindprøvediet.

4. REFERENCER

- (1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 A*. Decision of the Council C(81) 30 Final.

Tillæg 1

SCAS-test: eksempel på resultater

Stof	C_T (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	Procent bionedbrydning D_{da}	Testens varighed (dage)
4-acetylamino benzensulfonat	17,2	2,0	85	40
Tetrapropylbenzensulfonat	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrophenol	16,9	0,8	95,3	40
Diethylen glycol	16,5	0,2	98,8	40
Anilin	16,9	1,7	95,9	40
Cyclopentantetracarboxylat	17,9	3,2	81,1	120

Tillæg 2

Eksempel på apparatur

Figur 1

