

II

(Icke-lagstiftningsakter)

FÖRORDNINGAR

KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EU) nr 260/2014

av den 24 januari 2014

om ändring, för anpassning till den tekniska utvecklingen, av förordning (EG) nr 440/2008 om testmetoder enligt Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach)

(Text av betydelse för EES)

EUROPEISKA KOMMISSIONEN HAR ANTAGIT DENNA FÖRORDNING

med beaktande av fördraget om Europeiska unionens funktions-sätt,

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

av följande skäl:

- (1) I kommissionens förordning (EG) nr 440/2008⁽²⁾ fastställs testmetoder som ska användas för tillämpning av förordning (EG) nr 1907/2006 när det gäller bestämning av ämnens fysikalisk-kemiska egenskaper, toxicitet och ekotoxicitet.
- (2) Det är nödvändigt att uppdatera förordning (EG) nr 440/2008 för att med prioritet införa nya och uppdaterade testmetoder som nyligen har antagits av OECD, i syfte att minska användningen av djur för försöksändamål, i enlighet med Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av

djur som används för vetenskapliga ändamål⁽³⁾ och rådets direktiv 86/609/EEG av den 24 november 1986 om tillnärmning av medlemsstaternas lagar och andra författningar om skydd av djur som används för försök och andra vetenskapliga ändamål⁽⁴⁾.

- (3) Anpassningen omfattar två metoder för bestämning av fysikalisk-kemiska egenskaper, varav en uppdaterad testmetod för vattenlöslighet och en ny testmetod för fördelningskoefficient som är relevant för långlivade, bioackumulerande och toxiska ämnen (PBT-ämnena); fyra nya metoder och en uppdaterad metod för bestämning av ekotoxicitet och omvandling, spridning och fördelning i miljön; nio metoder för bestämning av toxicitet och andra hälsoeffekter (inklusive fyra testmetoder för inhalationstoxicitet), varav tre uppdaterade metoder och en ny metod för att minska antalet djur som används och för att förbättra bedömningen av effekter, en uppdaterad metod för 28-dagars toxicitetstest med upprepad oral dosering som nu innefattar parametrar för bedömning av endokrin aktivitet, en uppdaterad testmetod för toxikokinetik som är viktig för utformning och förståelse av toxikologiska studier samt uppdaterade metoder för test av kronisk toxicitet, test av karcinogenicitet och kombinerat test av kronisk toxicitet och karcinogenicitet.
- (4) Förordning (EG) nr 440/2008 bör därför ändras i enlighet med detta.
- (5) De åtgärder som föreskrivs i denna förordning är förenliga med yttrandet från den kommitté som inrättats enligt artikel 133 i förordning (EG) nr 1907/2006.

⁽¹⁾ EUT L 396, 30.12.2006, s. 1.

⁽²⁾ EUT L 142, 31.5.2008, s. 1.

⁽³⁾ EUT L 276, 20.10.2010, s. 33.

⁽⁴⁾ EGT L 358, 18.12.1986, s. 1.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Bilagan till förordning (EG) nr 440/2008 ska ändras i enlighet med bilagan till den här förordningen.

Artikel 2

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

Denna förordning är till alla delar bindande och direkt tillämplig i alla medlemsstater.

Utfärdad i Bryssel den 24 januari 2014.

På kommissionens vägnar
José Manuel BARROSO
Ordförande

BILAGA

Bilagan till förordning (EG) nr 440/2008 ska ändras på följande sätt:

(1) Kapitel A.6 ska ersättas med följande:

"A.6 VATTENLÖSLIGHET

INLEDNING

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

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

2. Ett ämnes vattenlöslighet kan påverkas avsevärt av förekomsten av orenheter. Den här testmetoden behandlar bestämningen av löslighet i vatten av i huvudsak rena ämnen som är stabila i vatten och inte flyktiga. Innan man kan göra en bestämning av vattenlöslighet är det användbart med några preliminära uppgifter om testämnet, såsom strukturformel, ångtryck, dissociationskonstant och hydrolys som en funktion av pH.
3. Två metoder finns beskrivna här: kolonnelueringsmetoden och kolvmetoden som täcker respektive löslighet under och över 10^{-2} g/l. Ett enkelt inledande test finns också beskrivet. Det anger det ungefärliga lämpliga antalet provtagningar för det slutliga testet, liksom den tid som åtgår för att uppnå mättnad.

DEFINITIONER OCH ENHETER

4. Ett ämnes löslighet i vatten är mättnadskoncentrationen av det ämnet i vatten vid en given temperatur.
5. Vattenlöslighet uttrycks i mängden löst ämne per volym av lösningen. SI-enheten är kg/m^3 , men g/l kan också användas.

REFERENSKEMIKALIER

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

BESKRIVNING AV METODER

Testbetingelser

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

Inledande test

8. I ett stegvist förfarande ska ökande volymer vatten vid rumstemperatur tillsättas till ca 0,1 g av provet (fasta testämnen måste pulvreras) i ett 10 ml mätglas med glaspropp. Blandningen skakas i 10 minuter efter varje tillsats av vatten och avsynas för eventuella upplösta delar av provet. Om provet eller delar av det fortfarande inte är upplöst efter tillsats av 10 ml vatten ska försöket fortgå i ett 100 ml mätglas. Den ungefärliga lösligheten anges i tabell 1 för den volym vatten där fullständig upplösning av provet sker. Det kan ta lång tid att lösa upp ett testämne när lösligheten är låg och minst 24 timmar bör avsättas för det. Om testämnet efter 24 timmar fortfarande inte är upplöst bör man avsätta längre tid (upp till 96 timmar), eller mer späda ut mer för att kunna fastställa om kolonnelueringsmetoden eller kolvmetoden bör användas.

Tabell 1

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

Kolonnlueringsmetoden

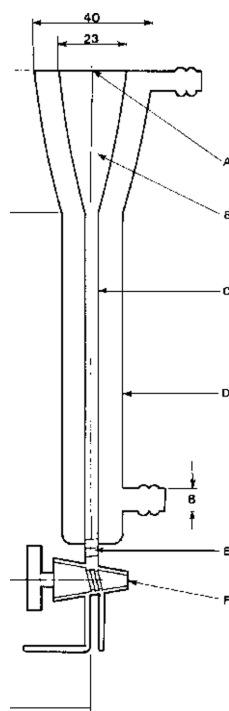
Principen

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

Utrustning

- Utrustningen består av en mikrokolonn (figur 1), som hålls i konstant temperatur. Den är antingen ansluten till en cirkulationspump (figur 2) eller ett nivåkärl (figur 3). Mikrokolonnen innehåller en inert bärare som hålls på plats av en liten plugg av glasull som också används för att filtrera partiklar. Material som kan användas som bärare är glaspärlor, kiselgur eller andra inerta material.
- Mikrokolonnen som visas i figur 1 är lämplig för uppställningen av cirkulationspumpen. Den har ett gasutrymme för fem bäddvolymner (kasseras i början av försöket) och volym för fem prover (som tas bort för analys under försöket). Ett annat alternativ är att minska storleken om vatten kan tillsättas under försöket som ersättning för de fem första bäddvolymerna med orenheter som har avlägsnats. Kolonnen är ansluten till cirkulationspumpen med ett rör tillverkat i ett inert material med en kapacitet på ca 25 ml/tim. Cirkulationspumpen kan t.ex. vara en peristaltisk pump eller en membranpump. Försiktighet måste iaktas så att ingen förorening och/eller adsorption uppstår i rörmaterialet.
- Ett schematiskt arrangemang med ett nivåkärl visas i figur 3. I detta arrangemang är mikrokolonnen försedd med en envägsventil. Anslutningen till nivåkärlet består av inslipad hals och rör tillverkat i ett inert material. Flödes hastigheten från nivåkärlet bör vara ca 25 ml/tim.

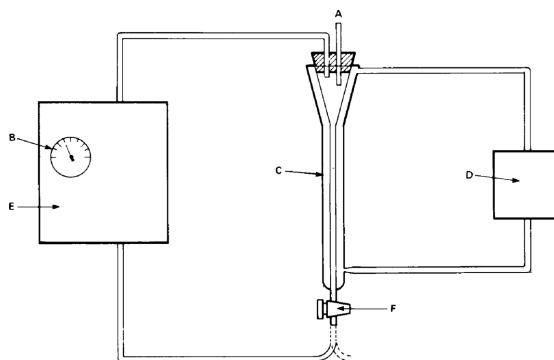
Figur 1



Dimensioner i mm

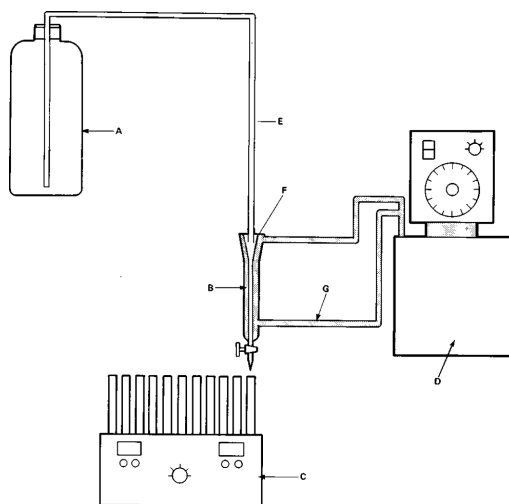
- A. Anslutning för inslipad hals
- B. Gasutrymme
- C. Inner 5
- D. Ytter 19
- E. Plugg av glasull
- F. Envägsventil

Figur 2



- A. Atmosfärisk jämvikt
- B. Flödesmätare
- C. Mikrokolonn
- D. Termostatreglerad cirkulationspump
- E. Cirkulationspump
- F. Tvåvägsventil för provtagning

Figur 3



- A. Nivåkäril (t.ex. 2,5 liter kemisk kolv)
- B. Kolonn
- C. Fraktionsackumulator
- D. Termostat
- E. Teflonrör
- F. Inslipad hals
- G. Vattenlinje (mellan termostat och kolonn, innerdiameter ca 8 mm)

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

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

Procedur vid användning av en cirkulationspump

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

Procedur vid användning av ett nivåkärl

16. Successiva fraktioner av eluatet samlas in och analyseras med den valda metoden. Fraktioner av eluatet från mellanintervallet, där koncentrationerna är konstanta inom $\pm 30\%$ av minst fem successiva fraktioner, används för att fastställa lösligheten.
17. Det föredragna eluatet är dubbeldestillerat vatten. Avjoniserat vatten med en resistivitet på över 10 megaohm/cm och ett totalt innehåll av organiskt kol lägre än 0,01 % kan också användas.
18. För båda procedurerna utförs en andra omgång, med halverad flödes hastighet jämfört med den första. Testet är lyckat om resultatet från de två omgångarna överensstämmer. Om den uppmätta lösligheten är högre med den lägre flödes hastigheten, måste halveringen av flödes hastigheten fortsätta tills två successiva omgångar ger samma löslighet.
19. I båda förfarandena ska fraktionerna kontrolleras beträffande förekomsten av kolloidalt material genom undersökning av Tyndalleffekten. Förekomsten av partiklar gör testet ogiltigt, och testet ska upprepas efter förbättringar av kolonnens filtrering.
20. Varje provs pH mäts med särskilda indikatorremсор.

Kolvmetoden

Principen

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

Utrustning

22. Följande material behövs:

- Vanliga laboratorieglass och instrument.
- En anordning för omskakning av lösningar vid kontrollerad, konstant temperatur.
- En centrifug (företrädesvis termostatreglerad) om det behövs.
- Analysutrustning.

Procedur

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

30 °C i två, respektive tre, dagar. Testet är lyckat om den uppmätta koncentrationen i åtminstone två av de sista kärnen inte avviker med mer än 15 %. Om resultaten från kärn 1, 2 och 3 visar ökande värden, bör hela testet göras om med längre ekvibreringstider.

24. Testet kan också utföras utan föregående inkubation vid 30 °C. För att uppskatta graden av etablering av mätnadsjämnikten tas prover tills omrörning inte längre påverkar de uppmätta koncentrationerna.
25. Varje provs pH mäts med särskilda indikatorremсор.

Analytiska bestämningar

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

DATA OCH RAPPORTERING

Data

Kolonnlueringsmetoden

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

Kolvmetoden

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

Testrapport

Kolonnlueringsmetoden

29. Testrapporten måste innehålla följande information:

- Resultat från det inledande testet.
- Kemisk beteckning och orenheter (eventuellt inledande reningssteg).
- Koncentrationer, flödes hastigheter och pH för varje prov.
- Medelvärden och standardavvikelser från minst fem prov från mätnadsplatån för varje omgång.
- Medelvärdet av minst två successiva omgångar.
- Temperaturen på vattnet under mätnadsförloppet.
- Analysmetod.
- Typ av bärämne.
- Laddning av bärämnet.
- Lösningssmedel som används.
- Tecken på eventuell kemisk instabilitet hos ämnet under testet.
- All information som är relevant för tolkningen av resultaten, särskilt med avseende på orenheter och fysikaliskt tillstånd hos testämnet.

Kolvmetoden

30. Testrapporten måste innehålla följande information:

- Resultat från det inledande testet.
- Kemisk beteckning och orenheter (eventuellt inledande reningssteg).

- Enskilda analytiska bestämningar och medelvärde, om fler än ett värde fastställdes för varje kolv.
- pH för varje prov.
- Medelvärdet för olika kolvar vilka var i överensstämmelse.
- Testtemperatur.
- Analysmetod.
- Tecken på eventuell kemisk instabilitet hos ämnet under testet.
- All information som är relevant för tolkningen av resultaten, särskilt med avseende på orenheter och fysikaliskt tillstånd hos testämnet.

LITTERATUR

- (1) Kommissionens direktiv 92/69/EEG av den 31 juli 1992 om anpassning till tekniska framsteg för sjuttonde gången av rådets direktiv 67/548/EEG om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen, EGT L 383, 29.12.1992, s. 113–114.
 - (2) NF T 20-045 (AFNOR) (september 1985). Kemiska produkter för industriell användning – Fastställande av vattenlöslighet för fasta ämnen och vätskor med låg löslighet – kolonnlueringsmetoden.
 - (3) NF T 20-046 (AFNOR) (september 1985). Kemiska produkter för industriell användning – Fastställande av vattenlöslighet av fasta ämnen och vätskor med hög löslighet – kolvmotoden.”
- (2) Kapitel A.23 ska läggas till:

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

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 123 (2006). Fördelningskoefficient 1-oktanol/vatten (P_{OW}) med $\log P_{OW}$ -värden upp till 8,2 har noggrant bestämts genom metoden med långsam omrörning (1). Den lämpar sig därför för direkt bestämning av P_{OW} för mycket hydrofoba ämnen.
2. Andra metoder för bestämning av fördelningskoefficienten 1-oktanol/vatten (P_{OW}) är ”skakkolvmotoden” (2), där P_{OW} bestäms utifrån retentionstiden vid HPLC-analys med omvänd fas (3). Skakkolvmotoden ger ofta upphov till artefakter beroende på att mikroskopiska droppar av oktanol övergår i vattenfasen. Med ökande värden på P_{OW} leder närvaron av dessa droppar i allt högre grad till att testämnets koncentration i vattnet överskattas. Metoden kan därför bara användas för ämnen med $\log P_{OW} < 4$. Den andra metoden bygger på en tillförlitlig uppsättning direktbestämda P_{OW} -värden som används för att kalibrera förhållandet mellan retentionstiden med HPLC och de uppmätta P_{OW} -värdena. Det har funnits ett utkast till OECD-riktlinjer tillgängligt för bestämning av fördelningskoefficienten 1-oktanol/vatten för joniserbara ämnen (4), men detta ska inte längre användas.
3. Den här testmetoden har utvecklats i Nederländerna. Precisionen för de förfaranden som beskrivs här har validerats och optimerats genom interkalibrering med 15 deltagande laboratorier (5).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

Betydelse och användning

4. För inerta organiska ämnen har man funnit att det finns ett mycket tydligt samband mellan deras fördelningskoefficient 1-oktanol/vatten (P_{OW}) och deras bioackumulering i fisk. Det har dessutom konstaterats att det finns ett samband mellan kemikaliers P_{OW} och deras toxicitet för fisk samt mellan deras P_{OW} och förmåga att bindas till fasta material som jord och sediment. För en utförlig översikt över dessa samband, se hänvisning (6).

5. Det har fastställts en rad samband mellan fördelningskoefficienten 1-oktanol/vatten och andra ämnesegenskaper som är av betydelse inom miljötoxikologi och miljökemi. Fördelningskoefficienten 1-oktanol/vatten har därför kommit att bli en mycket viktig parameter vid bedömning av miljörisker med kemikalier och för att förutsäga hur de kommer att uppföra sig i miljön.

Tillämpningsområde

6. Metoden med långsam omrörning är tänkt att minska bildningen av mikrodroppar av 1-oktanol i vattenfasen. Detta torde minska risken för att koncentrationen i vattnet överskattas på grund av att molekyler av testämnet binds till sådana droppar. Metoden lämpar sig därför särskilt väl för bestämning av P_{OW} för ämnen som antas ha log P_{OW} -värden på 5 och högre, för vilka skakvolymetoden (2) lätt kan ge felaktiga resultat.

DEFINITIONER OCH ENHETER

7. Ett ämnes fördelningskoefficient mellan vatten och ett lipofilt lösningsmedel (1-oktanol) beskriver dess jämviktsfördelning mellan de båda faserna. Fördelningskoefficienten 1-oktanol (P_{OW}) definieras som förhållandet mellan testämnets jämviktskoncentrationer i 1-oktanol mättad med vatten (C_O) och i vatten mättat med 1-oktanol (C_W).

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

Fördelningskoefficienten är en dimensionslös storhet eftersom den beskriver förhållandet mellan två koncentrationer. Den uttrycks vanligen som tiologaritmen ($\log P_{OW}$). P_{OW} är temperaturberoende, och rapporterade data måste därför omfatta en angivelse av temperaturen vid mätningen.

PRINCIP FÖR METODEN

8. Vid bestämning av fördelningskoefficienten bringas vatten, 1-oktanol och testämnet i jämvikt med varandra vid konstant temperatur. Därefter bestäms testämnets koncentration i de båda faserna.
9. Man kan minska problemet med bildning av mikroskopiska droppar under skakvolvförsöket genom att använda metoden med långsam omrörning som beskrivs här. Metoden går ut på att vatten, 1-oktanol och testämnet bringas i jämvikt i ett termostatreglerat reaktionskärl under omrörning. Utbytet mellan faserna påskyndas genom omrörning. Omrörningen gör också att det uppkommer viss turbulens som ökar utbytet mellan 1-oktanol och vatten utan att mikroskopiska droppar bildas (1).

TILLÄMPBARHET FÖR TESTMETODEN

10. Eftersom förekomsten av andra ämnen än testämnet kan påverka testämnets aktivitetskoefficient, bör testämnet testas som ett rent ämne. Den högsta renhet som är kommersiellt tillgänglig ska användas för fördelningsförsöket med 1-oktanol/vatten.
11. Den aktuella metoden gäller rena ämnen som inte upplöses eller förenas, och som inte visar någon signifikant gränsskiktsaktivitet. Den kan tillämpas för att bestämma fördelningsförhållandet för 1-oktanol/vatten för sådana ämnen och blandningar. När metoden används för blandningar, är fördelningsförhållandena som fastställs för 1-oktanol/vatten villkorade och beroende av den testade blandningens kemiska sammansättning och på elektrolytens sammansättning som används som vattenfas. Vidtas ytterligare åtgärder är metoden också tillämplig för dissocierings- eller associeringsföreningar (punkt 12).
12. På grund av att multipel jämvikt i vatten och 1-oktanol inblandad i fördelningen 1-oktanol/vatten av dissocierade ämnen såsom organiska syror och fenoler, organiska baser och metallorganiska ämnen, är fördelningsförhållandet 1-oktanol/vatten en villkorad konstant starkt beroende av elektrolytsammansättning (7) (8). Bestämningen av fördelningsförhållandet för 1-oktanol/vatten kräver därför att pH och elektrolytsammansättning kontrolleras i försöket och rapporteras. En sakkunnig bedömning måste användas vid utvärderingen av dessa fördelningsförhållanden. När värdet för dissociationskonstant(er) används måste lämpliga pH-värden väljas så att ett fördelningsförhållande fastställs för varje joniseringsstillstånd. Icke-komplexbildande buffertar måste användas vid testning av metallorganiska föreningar (8). Med beaktande av befintlig kunskap om vattenkemi (komplexbildningskonstanter, dissociationskonstanter) bör testbetingelserna väljas på ett sådant sätt att specificeringen av testämnet i vattenfasen kan beräknas. Jonstyrkan bör vara identisk i alla försök genom användning av en bakgrundelektrolyt.
13. Under testet kan svårigheter uppstå för ämnen med låg vattenlöslighet eller högt P_{OW} , på grund av att halterna i vattnet blir så låga att det blir svårt att göra en noggrann bestämning. Den här testmetoden ger vägledning i hur man hanterar detta problem.

INFORMATION OM TESTÄMNET

14. Kemiska reagenser bör vara av analytisk renhetsgrad eller renare. För detta test rekommenderas omärkta testämnen med känd kemisk sammansättning och en renhet som helst uppgår till minst 99 %, eller radioaktivt märkta ämnen med känd kemisk sammansättning och radiokemisk renhet. När ämnen med kort halveringstid används för märkningen är det nödvändigt att korrigera för sönderfallet. För radioaktivt märkta testämnen bör man använda en analysmetod som är specifik för kemikalien i fråga, så att man kan vara säker på att den uppmätta radioaktiviteten härrör direkt från testämnet.
15. Värdet på $\log P_{OW}$ kan uppskattas med hjälp av kommersiellt tillgänglig programvara eller genom att man jämför testämnets löslighet i de båda lösningsmedlen.
16. Innan P_{OW} bestäms med den här metoden bör man ha tillgång till följande information om testämnet:
 - a) Strukturformel.
 - b) Analysmetoder som lämpar sig för att bestämma ämnets koncentration i vatten och 1-oktanol.
 - c) Dissociationskonstant(er) för joniserbara ämnen (OECD:s riktlinje 112 (9)).
 - d) Vattenlöslighet (10).
 - e) Abiotisk hydrolysis (11).
 - f) Biologisk nedbrytbarhet (12).
 - g) Ångtryck (13).

METODBESKRIVNING

Utrustning

17. Vanlig laboratorieutrustning behövs, i synnerhet följande:
 - Magnetomrörare och teflonbelagda magnetstavar används för omrörning i vattenfasen.
 - Analysinstrument som lämpar sig för att bestämma testämnets koncentration i det förväntade koncentrationsintervallet.
 - Omrörningskärl med en kran i botten. Beroende på testämnets uppskattade $\log P_{OW}$ -värde och den använda analysmetodens detektionsgräns (LOD) kan det vara nödvändigt att använda ett kärl med samma geometri som är större än en liter, så att vattenvolymen är tillräckligt stor för att möjliggöra kemisk extraktion och analys. På så sätt erhålls högre koncentrationer i vattenextraktet och därmed en mer tillförlitlig analytisk bestämning. I tillägg 1 finns en tabell med uppskattade minsta volymer, detektionsgränsen för testämnet, dess uppskattade $\log P_{OW}$ och dess vattenlöslighet. Tabellen baseras på förhållandet mellan $\log P_{OW}$ och kvoten mellan ämnets löslighet i oktanol och vatten, såsom beskrivits av Pinsuwan m.fl. (14):

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

där

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

samt på det förhållande för att uppskatta vattenlöslighet som beskrivits av Lyman (15). Vattenlösligheten enligt den formel som anges i tillägg 1 ska ses som en första uppskattning. Observera att det står användaren fritt att uppskatta vattenlösligheten genom samband som bättre anses representera förhållandet mellan hydrofobicitet och löslighet. För fasta föreningar rekommenderas exempelvis att man vid uppskattning av lösligheten tar hänsyn till smältpunkten. När en modifierad ekvation används bör man förvissa sig om att ekvationen för beräkning av lösligheten i oktanol fortfarande är giltig. En schematisk ritning av ett glas-mantlat omrörningskärl med en volym på ca en liter finns i tillägg 2. Proportionerna på kärlet som visas i tillägg 2 har visat sig vara gynnsamma och bör bibehållas när utrustning av annan storlek används.

- Under försöket med långsam omrörning är det nödvändigt att hålla temperaturen konstant.

18. Kärlet bör vara tillverkat av ett inert material så att adsorptionen på kärlets väggar och botten är försumbar.

Beredning av testlösningar

19. Bestämningen av P_{OW} bör göras med den renaste 1-oktanol som finns i handeln (minst + 99 %). Det rekommenderas att 1-oktanol renas genom extraktion med syra, bas och vatten samt efterföljande torkning. 1-oktanol kan också renas genom destillation. Renad 1-oktanol används för att bereda standardlösningar av testämnen. Det vatten som används för bestämningen av P_{OW} ska vara destillerat i utrustning av glas eller kvarts, eller ska komma från ett reningssystem. Vatten av HPLC-kvalitet kan också användas. Destillerat vatten måste filtreras genom ett 0,22 μm filter, och för att kontrollera att de koncentrerade extrakten inte innehåller några föroreningar som kan reagera med testämnet måste blankprover ingå. Om ett glasfiberfilter används ska det rengöras genom upphettning vid 400 °C i minst tre timmar.
20. Innan försöket inleds mätts de båda lösningsmedlen med varandra genom att bringas i jämvikt i ett tillräckligt stort kärl. Detta åstadkoms genom långsam omrörning av tvåfasset i två dagar.
21. En lämplig koncentration av testämnet väljs och löses i 1-oktanol (mättad med vatten). Fördelningskoefficienten 1-oktanol/vatten ska bestämmas i utspädda lösningar i 1-oktanol och vatten. Testämnets koncentration bör därför inte överstiga 70 % av dess löslighet med en högsta koncentration på 0,1 M i endera fasen (1). De lösningar i 1-oktanol som används för försöket får inte innehålla något uppslammat testämne i fast form.
22. En lämplig mängd av testämnet löses i 1-oktanol (mättad med vatten). Om den uppskattade $\log P_{OW}$ är större än fem måste man se till att de lösningar i 1-oktanol som används för försöket inte innehåller något uppslammat testämne i fast form. För att undvika detta ska följande metod användas för kemikalier vars uppskattade $\log P_{OW}$ -värde är > 5:

- Lös testämnet i 1-oktanol (mättad med vatten).
- Vänta tills det uppslammade fasta ämnet har sjunkit till botten. Kontrollera testämnets koncentration under väntetiden.
- Vänta tills testämnets koncentration i 1-oktanol har stabiliserats och späd därefter stamlösningen med en lämplig volym 1-oktanol.
- Mät den utspädda stamlösningens koncentration. Om den uppmätta koncentrationen stämmer med utspädningen kan stamlösningen användas för försöket.

Extraktion och analys av prover

23. En validerad analysmetod ska användas för bestämning av testämnet. De som utför försöket måste kunna styrka att koncentrationerna både i den vattenmättade 1-oktanol och i den 1-oktanol-mättade vattenfasen ligger över den använda analysmetodens kvantifieringsgräns. Om det är nödvändigt att extrahera testämnet från vattenfasen och 1-oktanol-fasen måste utbytet vid extraktion från respektive fas fastställas innan försöket inleds. Signalen måste korrigeras för blankvärden och det är viktigt att se till att ingen analyt överförs från ett prov till ett annat.
24. För hydrofoba testämnen som har relativt låga koncentrationer i vattenfasen är det troligen nödvändigt att extrahera vattenfasen med ett organiskt lösningsmedel och att koncentrera extraktet före analys. Av samma anledning är det också nödvändigt att blankproverna har en mycket låg koncentration. Därför måste mycket rena lösningsmedel användas, helst lösningsmedel för spårämnesanalys. Risken för att föroreningar överförs mellan proverna kan också minskas genom att man använder noggrant rengjord glasutrustning (den kan t.ex. sköljas i lösningsmedel eller upphettas vid hög temperatur).
25. Värdet på $\log P_{OW}$ kan uppskattas med hjälp av ett uppskattningsprogram eller genom sakkunnig bedömning. Om det är högre än 6 är det viktigt att korrigera för blankvärdena och kontrollera att det inte sker någon överföring av analyt mellan proverna. Om det uppskattade $\log P_{OW}$ -värdet överskrider 6 måste man använda en surrogatstandard för att korrigera för utbytet så att provet kan koncentreras så mycket som möjligt före analys. Ett antal program för uppskattningen av $\log P_{OW}$ finns kommersiellt tillgängliga ⁽¹⁾, t.ex. Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) och ACD log P (19). I hänvisningarna (20–22) beskrivs olika metoder för att uppskatta $\log P_{OW}$.

⁽¹⁾ Denna information ges endast som information till användarna. Andra motsvarande datorprogram kan användas om man kan visa att de ger samma resultat.

26. Kvantifieringsgränserna för bestämning av testämnet i 1-oktanol och vatten ska fastställas med vedertagna metoder. Som en tumregel kan kvantifieringsgränsen anses vara den koncentration i vatten eller 1-oktanol som ger ett signal-brusförhållande på tio. En lämplig extraktions- och förkoncentrationsmetod ska väljas, och utbytet vid analysen ska också anges. En lämplig grad av förkoncentrering väljs så att en signal av erforderlig storlek erhålls vid den analytiska bestämningen.
27. På grundval av analysmetodens parametrar och de förväntade koncentrationerna bestäms den ungefärliga provstorlek som krävs för en korrekt bestämning av ämnets koncentration. Man bör undvika att använda vattenprover som är så små att man inte erhåller en tillräcklig signal. Man bör likaså undvika alltför stora vattenprover, eftersom det annars kan hända att det inte finns tillräckligt mycket vatten kvar för att göra det erforderliga antalet analyser ($n = 5$). I tillägg 1 anges den minsta provvolymen som en funktion av kärlets volym, testämnets detektionsgräns och dess löslighet.
28. Testämnena kvantifieras genom jämförelser av kalibreringskurvorna för respektive ämne. De analyserade provernas koncentrationer måste ligga i samma intervall som standardlösningarnas koncentrationer.
29. För testämnen vars uppskattade $\log P_{OW}$ är högre än 6 måste vattenprovet spikas med en surrogatstandard före extraktionen, så att förlusterna vid extraktion och förkoncentrering av vattenproverna kan bedömas. För att utbytet ska kunna korrigeras så exakt som möjligt måste surrogatstandardens egenskaper vara mycket lika eller identiska med testämnets egenskaper. Helst ska (stabila) isotopmärkta analoger av testämnet (t.ex. deuterium- eller ^{13}C -märkta) användas. Om det inte är möjligt att använda stabila isotopmärkta analoger såsom ^{13}C eller 2H ska det genom tillförlitliga litteraturuppgifter visas att surrogatstandardens fysikalisk-kemiska egenskaper ligger mycket nära testämnets. Vid vätske-vätskeextraktionen av vattenfasen kan emulsioner bildas. Detta problem kan minskas genom tillsats av salt och genom att man låter emulsionen klarna över natten. I rapporten ska det anges vilka metoder som används för extraktion och förkoncentrering av proverna.
30. Prover som tas från 1-oktanolfasen kan vid behov spädas med ett lämpligt lösningsmedel före analys. Dessutom rekommenderas att utbytet korrigeras genom användning av surrogatstandarder om det vid försök visat sig att utbytet varierar mycket (relativ standardavvikelse $> 10\%$).
31. Rapporten ska omfatta detaljerade uppgifter om den använda analysmetoden. Hit hör extraktions- och förkoncentrationsmetoder, utspädningsfaktorer, instrumentparametrar, kalibreringsrutin, kalibreringsområde, analytisk utbyte av testämnet från vatten, tillsats av surrogatstandarder för korrigerings av utbytet, blankvärden, detektionsgränser och kvantifieringsgränser.

Testförfarande

Optimala volymförhållanden för 1-oktanol och vatten

32. När man väljer volymerna av 1-oktanol och vatten bör man beakta kvantifieringsgränserna i 1-oktanol och vatten, graden av förkoncentration av vattenproverna, provtagningsvolymerna i 1-oktanol och vatten och de förväntade koncentrationerna. Av experimentella skäl bör volymen av 1-oktanol väljas så att skiktet av 1-oktanol blir så tjockt ($> 0,5$ cm) att det är möjligt att ta prover från 1-oktanolfasen utan att den störs.
33. Vid bestämning av fördelningskoefficienten för ämnen med $\log P_{OW}$ på 4,5 och högre används typiskt 20 till 50 ml 1-oktanol och 950 till 980 ml vatten i ett enliterskärl.

Testbetingelser

34. Reaktionskärlet ska vara termostatreglerat så att temperaturvariationen under försöket är mindre än $1^\circ C$. Försöket ska utföras vid $25^\circ C$.
35. Försökssystemet måste skyddas från dagsljus, antingen genom att försöket utförs i ett mörkt rum eller genom att reaktionskärlet täcks med aluminiumfolie.
36. Försöket ska utföras i en så dammfri miljö som möjligt.
37. Blandningen av 1-oktanol och vatten rörs om tills jämvikt inställer sig. Hur lång tid det tar att uppnå jämvikt bestäms i ett pilotförsök där prover på vatten och 1-oktanol tas med jämna mellanrum. Det ska gå minst fem timmar mellan provtagningstillfällena.
38. Varje bestämning av P_{OW} ska bygga på minst tre oberoende omrörningsförsök.

Bestämning av jämviktstiden

39. Jämvikt antas ha inställt sig när man vid regression av koncentrationsförhållandet mellan 1-oktanol och vatten som en funktion av tiden, över en tidsrymd som omfattar fyra punkter, får en lutning som inte avviker nämnvärt från 0 vid en p-nivå på 0,05. Systemet måste bringas i jämvikt under minst en dag innan provtagningen inleds. Som en tumregel kan provtagning av ämnen med ett uppskattat $\log P_{OW}$ mindre än 5 göras under dag två och tre. För mer hydrofoba ämnen kan det ta längre tid att uppnå jämvikt. För ett ämne med ett $\log P_{OW}$ på 8,23 (dekaklorbifenyl) krävdes 144 timmar för att nå jämvikt. För att avgöra om jämvikt inställt sig tas upprepade prover från ett och samma kärl.

Försökets inledning

40. Försöket inleds genom att reaktionskärlet fylls med vatten mättat med 1-oktanol. Kärlet får sedan stå tills den temperatur som termostaten är inställd på nås.
41. Därefter tillsätts försiktigt önskad mängd av testämnet (löst i erforderlig volym 1-oktanol mättad med vatten) till reaktionskärlet. Detta är ett kritiskt steg i försöket, eftersom man måste undvika turbulent blandning av de båda faserna. 1-oktanolfasen kan därför långsamt pipetteras mot reaktionskärlets vägg, nära vattenfasen. Den kommer att rinna längs glasväggen och bilda en film ovanpå vattenfasen. 1-oktanol får aldrig hållas direkt i reaktionskärlet och det är viktigt att se till att droppar av 1-oktanol inte faller direkt i vattnet.
42. Omröraren startas och omrörningshastigheten ökas långsamt. Om omrörarmotorn inte kan justeras ordentligt bör man överväga att använda en transformator. Omrörningshastigheten justeras så att strömvirveln i kontaktytan mellan vattnet och 1-oktanolen är 0,5 till högst 2,5 cm djup. Om strömvirveln är djupare än 2,5 cm ska omrörningshastigheten minskas. I annat fall kan det bildas mikrodroppar av 1-oktanol i vattenfasen, som leder till att testämnets koncentration i vattenfasen överskattas. Rekommendationen att omrörningshastigheten ska ge en virvel på högst 2,5 cm grundas på resultaten av den utförda interkalibreringen (5). Det är en kompromiss mellan önskan att snabbt uppnå jämvikt och att begränsa bildningen av mikroskopiska droppar av 1-oktanol.

Provtagning och provberedning

43. Omröraren stängs av före provtagningen och man väntar sedan tills vätskorna slutat röra sig. När provtagningen är avslutad startas omröraren igen, först långsamt och sedan gradvis snabbare såsom beskrivs ovan.
44. Prover på vattenfasen tas från en kran i botten av reaktionskärlet. Släng alltid bort den dödvolum vatten som finns i kranen (ca 5 ml i det kärl som visas i tillägg 2). Vattnet i kranen är inte omrört och är därför inte i jämvikt med resten av vätskan i kärlet. Anteckna vattenprovernas volym och se till att testämnet som finns i det slängda vattnet beaktas när massbalansen upprättas. Avdunstningsförlusterna minimeras genom att vattnet sakta får rinna in i separertratten, utan att vatten- och 1-oktanolfaserna störs.
45. Prover av 1-oktanol tas genom att små alikvoter (ca 100 μ l) avlägsnas från 1-oktanolfasen med en 100 mikrolitersspruta helt av glas och metall. Det är viktigt att de båda vätskorna inte blandas i kontaktytan. Den provtagna vätskans volym antecknas. Det räcker med små alikvoter eftersom 1-oktanolprovet späds ut.
46. Onödiga provöverföringssteg bör undvikas. Provvolymer bör därför bestämmas gravimetriskt. För vattenprover kan detta åstadkommas genom att man samlar upp vattenprovet i en separertratt som redan innehåller den erforderliga mängden lösningsmedel.

DATA OCH RAPPORTERING

47. Enligt den här metoden bestäms P_{OW} genom att man utför tre omrörningsförsök med det ämne som ska undersökas under identiska betingelser. Den regressionsanalys som används för visa att jämvikt uppnåtts ska grundas på resultaten av minst fyra på varandra bestämningar av C_O/C_W vid olika tidpunkter. På så sätt kan man beräkna variansen som ett mått på osäkerheten för det medelvärde som erhålls från varje försöksenhet.
48. P_{OW} kan beskrivas genom den varians i data som erhålls i varje försöksenhet. Denna information används för att beräkna P_{OW} som det vägda medelvärdet för resultaten i de enskilda försöksenheterna. Det inverterade värdet på variansen hos resultaten från försöksenheterna används som vikt. Detta leder till att data som uppvisar en stor variation (uttryckt som varians) och som därför är mindre tillförlitliga inte påverkar resultaten lika mycket som data med liten varians.

49. Den vägda standardavvikelsen beräknas på samma sätt. Den beskriver P_{OW} -mätningens repeterbarhet. Ett lågt värde på den vägda standardavvikelsen visar att bestämningen av P_{OW} har en mycket god repeterbarhet inom ett och samma laboratorium. Den formella statistiska behandlingen av erhållna data beskrivs nedan.

Behandling av resultaten

Demonstration av att jämvikt uppnåtts

50. Logaritmen för förhållandet mellan testämnets koncentrationer i 1-oktanol och vatten ($\log(C_o/C_w)$) beräknas för varje provtagningstidpunkt. För att visa att jämvikt uppnåtts plottas detta förhållande som en funktion av tiden. En plåtå i kurvan, som ska omfatta minst fyra på varandra följande mätpunkter, tyder på att jämvikt har uppnåtts och att ämnet verkligen är löst i 1-oktanol. Om så inte är fallet måste försöket fortgå tills fyra på varandra följande mätpunkter ger en lutning som inte avviker nämnvärt från 0 vid en p-nivå på 0,05, vilket anger att $\log C_o/C_w$ är oberoende av tid.

Beräkning av $\log P_{OW}$

51. Värdet på $\log P_{OW}$ i försöksenheter beräknas som det vägda medelvärdet för $\log C_o/C_w$ för den del av kurvan ($\log C_o/C_w$ som en funktion av tiden) där det har visats att jämvikt uppnåtts. Det vägda medelvärdet beräknas genom att data vägs med det inverterade värdet på variansen så att deras påverkan på slutresultatet är omvänt proportionell mot deras osäkerhet.

Genomsnittligt $\log P_{OW}$

52. Medelvärdet av $\log P_{OW}$ för olika försöksenheter beräknas som medelvärdet av resultaten från de enskilda försöken viktade med sina respektive varianser.

Beräkningen utförs med hjälp av följande formel:

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

där

$\log P_{OW,i}$ = $\log P_{OW}$ -värdet för den enskilda försöksenheten i

$\log P_{OW,Av}$ = det vägda medelvärdet för de enskilda bestämningarna av $\log P_{OW}$

w_i = den statistiska vikt som tilldelats $\log P_{OW}$ -värdet för försöksenhet i.

Den inverterade variansen för $\log P_{OW,i}$ används som w_i ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$).

53. Medelfelet av $\log P_{OW}$ uppskattas som den repeterbarhet för $\log C_o/C_w$ som bestäms under jämviktsfasen i varje enskild försöksenhet. Det uttrycks som den vägda standardavvikelsen för $\log P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log P_{OW,Av}}$) som i sin tur är ett mått på det fel som hänger samman med $P_{OW,Av}$. Den vägda standardavvikelsen kan beräknas från den viktade variansen ($\text{var}_{\log P_{OW,Av}}$) enligt följande formel:

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

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

Symbolen n står för antalet försöksenheter.

Testrapport

54. Testrapporten ska omfatta följande information:

Testämne:

- Trivialnamn, kemiskt namn, CAS-nummer, strukturformel (med angivande av den radioaktiva isotopens position för märkta ämnen) och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper (se punkt 17).
- Testämnets renhet (föreningar).
- Renhet och aktivitet per mol hos den isotop som använts för märkning (i förekommande fall).
- Preliminär uppskattning av $\log P_{ow}$ samt angivande av den metod som används för att komma fram till detta värde.

Försöksbetingelser:

- Datum för utförandet av studierna.
- Temperatur under försöket.
- Volymer av 1-oktanol och vatten i början av testet.
- Borttagna provvolymen av 1-oktanol och vatten.
- Volymer 1-oktanol och vatten som återstår i testkärnen.
- Beskrivning av reaktionskärn och omrörningsparametrar (omrörarmagnetens och reaktionskärlets form, strömvirvelns djup i mm samt omrörningshastigheten om denna är känd).
- Metoder som använts för att analysera testämnet och dess kvantifieringsgräns.
- Provtagningsstider.
- Vattenfasens pH-värde och eventuella buffertar som använts för att justera pH-värdet hos joniserbara molekyler.
- Antal replikat.

Resultat:

- De använda analysmetodernas repeterbarhet och känslighet.
- Koncentrationer av testämnet i 1-oktanol och vatten som funktion av tid.
- Demonstration av massbalans.
- Temperatur och standardavvikelse eller temperaturintervallet under försöket.
- En kurva som visar förhållandet mellan koncentrationer som funktion av tid.
- Medelvärde för $\log P_{ow,Av}$ och dess standardfel.
- Diskussion och tolkning av resultaten.
- Exempel på rådata från en representativ analys (i enlighet med god laboratoriesed ska alla rådata sparas) som omfattar uppgifter om utbyten för surrogatstandarder, antal punkter på kalibreringskurvan (med angivande av kriterier för kalibreringskurvas korrelationskoefficient) samt resultat av kvalitetssäkring och kvalitetskontroll (QA/QC).
- Samt när det finns tillgängligt: Valideringsrapport för analysmetoden (ska tas upp i litteraturhänvisningarna).

LITTERATUR

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

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

Tillägg 1

Kalkylblad för beräkning av de minsta vattenvolymer som krävs för detektion av testämnen med olika log P_{ow}-värden i vattenfasen

Antaganden:

- Maximal volym av enskilda alikvoter = 10 % av den totala volymen; 5 alikvoter = 50 % av den totala volymen.
- Testämnens koncentration = 0,7 × löslighet i endera fasen. Vid lägre koncentrationer krävs större volymer.
- Volym som används för bestämning av detektionsgräns = 100 ml.
- log P_{ow} som en funktion av log S_w och log P_{ow} som en funktion av SR (S_{okt}/S_w) åskådliggör testämnenas förhållanden på ett rimligt sätt.

Uppskattning av S_w

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

Uppskattning av S_{okt}

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

Testämnets totala massa (mg)	Massa _{okt} /Massa _{vatten}	Massa _{H2O} (mg)	Konc _{H2O} (mg/l)	Massa _{okt} (mg)	Konc _{okt} (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333

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

Beräkning av volymer

Minsta volym som krävs för H₂O-fasen vid olika detektionsgränser (uttryckta som koncentration)

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

Beräkningsnyckel

Utgör < 10 % av vattenfasens totala volym, 1 liters jämviktskär.

Utgör < 10 % av vattenfasens totala volym, 2 liters jämviktskär.

Utgör < 10 % av vattenfasens totala volym, 5 liters jämviktskär.

Utgör < 10 % av vattenfasens totala volym, 10 liters jämviktskär.

Överskrider 10 % även av ett 10 liters jämviktskär.

Översikt över erforderliga volymer som en funktion av vattenlösligheten och log P_{ow}

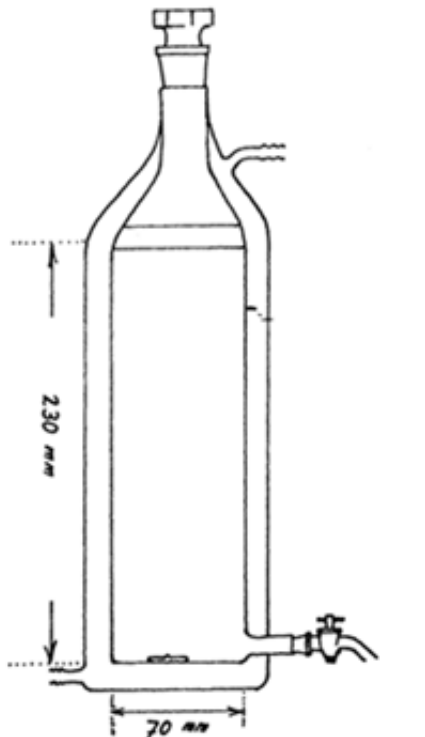
Minsta volym som krävs för H₂O-fasen vid olika detektionsgränser (ml)

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

log P _{ow}	S _w (mg/l)	Detektionsgräns (mikrogram/l)	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Använd volym vid detek- tionsgränsen (l)		0,1					

Tillägg 2

Exempel på glasmantlat reaktionskärl för det försök med långsam omrörning som används för att bestämma P_{OW}



(3) Kapitel B.2 ska ersättas med följande:

"B.2 AKUT INHALATIONSTOXICITET

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje 403 (2009) (1). Den ursprungliga testriktlinjen för akut inhalation 403 (TG 403) antogs 1981. Denna reviderade testmetod B.2 (som motsvarar den reviderade TG 403) har utformats för att vara mer flexibel, för att minska användningen av djur, och för att uppfylla regulatoriska behov. Den reviderade testmetoden presenterar två studietyper: Ett traditionellt LC_{50} -protokoll och ett koncentration \times tid-protokoll ($k \times t$). Den här testmetodens visar primärt förhållandet mellan koncentration-respons vars räckvidd sträcker sig från icke-dödlig till dödlig utgång så att man kan komma fram till en genomsnittlig dödlig koncentration (LC_{50}), icke-dödlig tröskelkoncentration (t.ex. $LC01$), och kurva, och för att identifiera en möjlig könsberoende mottaglighet. $K \times t$ -protokollet ska användas om det finns ett specifikt rättsligt eller vetenskapligt behov som kräver testning av djur som sträcker sig över flera tidsperioder, såsom katastrofhanteringsplanering (värden för att t.ex. komma fram till riktnivåer för akut exponering (AEGL), riktlinjer för katastrofhanteringsplanering (ERPG) eller tröskelvärden för akut exponering (AETL)), eller markanvändningsplanering.
2. I vägledningsdokumentet om akut inhalationstoxicitet (GD 39) (2) kan man få vägledning om den här beskrivna metodens genomförande och tolkning vid studier.
3. Definitioner som används inom ramen för den här metoden finns i slutet av det här kapitlet och i GD 39 (2).
4. Den här testmetoden möjliggör karakterisering och kvantitativ riskbedömning av testkemikalierna och gör det möjligt att rangordna och klassificera testkemikalierna i enlighet med förordning (EG) nr 1272/2008 (3). GD 39 (2) ger en vägledning om valet av en lämplig testmetod vid akuttestning. Om endast information om klassificering och märkning krävs, rekommenderas rent allmänt kapitel B.52 i denna bilaga (4) (se GD 39 (2)). Den här testmetoden B.2 är inte specifikt avsedd för testning av specialmaterial såsom svårösliga isometriska eller fibrösa material, eller avsiktligt tillverkade nanomaterial.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

5. Innan man överväger ett test i enlighet med den här testmetoden bör testlaboratoriet överväga all information avseende testkemikalien, inklusive befintliga studier (t.ex. kapitel B.52 i denna bilaga (4)) vars data visar att man inte behöver göra fler tester för att därmed minska djuranvändningen. Information som kan underlätta val av lämplig art, stam, kön, exponeringssätt och lämplig testkoncentration är ämnets identitet och kemiska struktur, fysikalisk-kemiska egenskaper, resultat från andra eventuella in vitro- eller in vivo-tester avseende toxicitet; förväntad användning och risken för mänsklig exponering, tillgängliga (Q)SAR-data samt toxikologiska data om strukturellt närbesläktade ämnen (se GD 39 (2)).
6. Testning av frätande och/eller irriterande kemikalier vid koncentrationer som förväntas orsaka svår smärta och/eller lidande bör undvikas så vitt det är möjligt. Eventuell frätning/irritation bör utvärderas genom en sakkunnig bedömning som grundas på erfarenheter från människa och djur (t.ex. genom upprepade doseringsstudier utförda med doser som inte är frätande/irriterande), befintliga in vitro-data (t.ex. från kapitel B.40, (5), B.40a (6) i denna bilaga eller OECD TG 435 (7)), pH-värden, information om liknande ämnen eller eventuellt andra relevanta data i syfte att undersöka om man kan undvika ytterligare testning. För specifika regulatoriska behov (t.ex. i beredningsplaneringssyften), kan den här testmetoden användas för att exponera djur för dessa ämnen, eftersom det ger försöksledaren eller den ansvarige provaren kontroll över valet av målkoncentrationer. I vilket fall som helst ska målkoncentrationer inte medföra allvarlig irritation/frätning, men ändå vara tillräckliga för att utvidga koncentrations-responskurvan till nivåer som gör att testets regulatoriska och vetenskapliga mål kan uppfyllas. Dessa koncentrationer ska väljas från fall till fall och det ska finnas en motivering för valet av koncentration (se GD 39 (2)).

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

7. Den här reviderade testmetoden B.2 har utformats för att man ska erhålla tillräcklig information om en testkemikalies akuta toxicitet för att klassificera den och tillhandahålla dödlighetsdata (t.ex. LC₅₀, LC₀₁ och lutning) för ett eller båda könen efter behov för kvantitativ riskbedömning. Den här testmetoden erbjuder två metoder. Den första metoden är ett traditionellt protokoll i vilka grupper av djur exponeras för en begränsad koncentration (toleranstest) eller en serie koncentrationer i ett stegvist förfarande under en förutbestämd period på normalt 4 timmar. Andra exponeringstider kan gälla för specifika regulatoriska ändamål. Den andra metoden är ett (k × t) protokoll i vilka grupper av djur exponeras för en (gränskoncentration) eller en serie av koncentrationer som sträcker sig över flera perioder.
8. Döende djur eller djur som visar tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande ska avlivas skonsamt och medtas i tolkningen av testresultaten på samma sätt som de som avled under testet. Kriterier för att ta beslutet att avliva döende eller svårt lidande djur, och vägledning om hur man känner igen tecknen på förutsägbar eller annalkande död, omfattas i OECD:s vägledningsdokument nr 19 om humana endpoints (8).

METODBESKRIVNING

Val av djurart

9. I testet används friska unga vuxna djur av stammar som vanligtvis används på laboratorier. För detta test används råtta och det ska motiveras om annan art används.

Förberedelse av djuren

10. Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga. På exponeringsdagen bör djuren vara unga vuxna 8 till 12 veckor gamla och kroppsvikten bör ligga inom ± 20 % av medelvikten för vardera könet av eventuella tidigare exponerade djur i samma ålder. Djuren väljs ut slumpmässigt och förses med märkning så att de kan identifieras individuellt. Därefter får djuren aklimatisera sig till laboratoriets betingelser i sina burar i minst fem dagar före teststarten. Djuren bör också aklimatisera sig till testutrustningen en kort period före testet, eftersom detta minskar den stress som en ny miljö innebär.

Djurhållning

11. Temperaturen i försöksdjurens utrymme bör vara 22 ± 3 °C. Den relativa fuktigheten bör ligga mellan 30 och 70 %, även om detta kanske inte är möjligt när vatten används som vehikel. Före och efter exponeringen bör djuren inhysas i grupper avhängigt kön och koncentration, dock får antalet djur per bur inte hindra en tydlig observation av varje enskilt djur, och förluster genom kannibalism och slagsmål bör minimeras. Om endast djurens nosar ska exponeras kan det vara nödvändigt att de får aklimatisera sig till fasthållningsrören. Fasthållningsrören ska inte medföra onödig fysisk, termisk eller fasthållningsstress för djuren. Fasthållning kan påverka fysiologiska endpoints såsom kroppstemperatur (hypotermi) och/eller minimala respiratoriska volymer. Om det finns generiska data tillgängliga som inte pekar på sådana förändringar i någon nämnvärd omfattning är det inte nödvändigt med anpassningen till rören före exponeringen. Djur vars hela kroppar ska exponeras för en aerosol ska inhysas individuellt under exponeringen för att förhindra att de andra djuren i buren filtrerar aerosolen

genom sina pålsar. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, utom under exponeringen, tillsammans med en obegränsad tillgång till vatten. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker.

Inhalationskammare

12. Vid val av inhalationskammare bör man beakta kemikalien beskaffenhet och testets ändamål. Det föredragna exponeringssättet är enbart nos (termen inkluderar även enbart huvud, enbart nos eller enbart tryne). Exponering av enbart nos föredras i allmänhet vid studier av vätskor och fasta aerosoler och ånga som kan kondenseras och bilda aerosoler. Vissa av undersökningens mål kan bättre uppnås genom exponering av hela kroppen, men detta ska motiveras i undersökningsrapporten. För att säkerställa atmosfärisk stabilitet vid användningen av en helkroppskammare ska den totala volymen av försöksdjuren inte överskrida 5 % av kammarens volym. Teknikerna för enbart nos och helkroppsexponeringen, deras principer och särskilda för- och nackdelar finns beskrivna i GD 39 (2).

EXPONERINGSBETINGELSER

Administration av koncentrationer

13. Enbart nos-exponering kan för rättor vara av vilken längd som helst upp till 6 timmar. Om möss exponeras enbart nos överskrider exponeringen i allmänhet inte 4 timmar. Motivering bör ges om längre tidsperioder för studier behövs (se GD 39 (2)). Djur som exponeras för aerosoler i helkroppskammare ska inhysas individuellt för att hindra intagandet av testkemikalien vid skötsel av de andra djuren i buren. Inget foder ska ges under exponeringsperioden. Vatten kan tillhandahållas under en helkroppsexponering.
14. Djur exponeras för testkemikalien som en gas, ånga, aerosol eller en blandning av dem. Det fysikaliska tillstånd som ska testas beror på testkemikalien fysikalisk-kemiska egenskaper, vald koncentration och/eller dess mest sannolika fysikaliska form vid hanteringen och användningen. Hygroskopiska och kemiskt reaktiva testkemikalier ska testas i torr luft. Det är viktigt att se till att inga explosiva koncentrationer skapas.

Partikelstorleksfördelning

15. Partikeldimensionering bör utföras för alla aerosoler och ångor som kan kondenseras och bilda aerosoler. För att möjliggöra exponering av alla relevanta områden i luftvägarna, rekommenderas aerosoler med en aerodynamisk diameter (MMAD) i intervallet 1 till 4 µm med en geometrisk standardavvikelse (σ_g) i intervallet 1,5 till 3,0 (2) (9) (10). Även om en rimlig ansträngning krävs för att uppfylla denna standard bör en sakkunnig bedömning göras om detta inte kan uppnås. Till exempel kan metalldimma understiga denna standard, och laddade partiklar, fibrer och hygroskopiska material (som ökar i storlek i den fuktiga miljön i andningsvägarna) kan överstiga denna standard.

Beredning av testkemikalie i en vehikel

16. En vehikel kan användas för att generera en lämplig koncentration och partikelstorlek av testkemikalien i atmosfären. I regel bör vatten ha företräde. För att uppnå den erfordrade partikelstorleksfördelningen bör partikelmaterial utsättas för mekaniska processer, emellertid bör man iaktta försiktighet så att inte testkemikalien sönderdelas eller förändras. I de fall där mekaniska processer tros ha förändrat testkemikalien sammansättning (t.ex. extrema temperaturer från friktionen vid överdriven fräsning), bör testkemikalien sammansättning verifieras analytiskt. Det är viktigt att testkemikalien inte förorenas. Det är inte nödvändigt att testa icke-spröda granulära material som avsiktligt är sammansatta så att de inte kan inhaleras. Ett friktionstest ska användas för att visa att inga inandningsbara partiklar bildas när det granulära materialet hanteras. Om ett friktionstest bildar inandningsbara ämnen ska ett test utföras avseende inhalationstoxicitet.

Kontrolldjur

17. Det är inte nödvändigt med en parallell negativ (luft-) kontrollgrupp. Om en annan vehikel än vatten används för att skapa testatmosfären ska en vehikelkontrollgrupp endast användas när historiska data om inhalationstoxicitet inte är tillgängliga. Om en toxicitetsstudie av en testkemikalie som har beretts i en vehikel inte påvisar någon toxicitet, framgår det att vehikeln är icke-toxisk vid den testade koncentrationen, och därmed finns det inget behov av en vehikelkontroll.

ÖVERVAKNING AV EXPONERINGSFÖRHÅLLANDEN

Kammarens luftflöde

18. Luftflödet genom kammaren ska omsorgsfullt kontrolleras, kontinuerligt övervakas och registreras minst en gång i timmen under varje exponering. Övervakningen av testatmosfärens koncentration (eller stabilitet) är en integrerad mätning av samtliga dynamiska parametrar och ett indirekt sätt att kontrollera alla relevanta atmosfärsskapande dynamiska parametrar. Särskild hänsyn bör tas för att undvika återandning i enbart nos-kammare

i de fall där luftflödet genom exponeringssystemet är otillräckligt för att ge ett dynamiskt flöde i testkemikalie-atmosfären. Det finns föreskrivna metoder som kan användas för att visa att återandning inte sker under de valda processförhållandena (2) (11). Syrehalten bör vara minst 19 % och koncentrationen av koldioxid bör inte överstiga 1 %. Om det finns anledning att tro att dessa standarder inte kan uppfyllas bör man mäta koncentrationen av syre och koldioxid.

Kammarens temperatur och relativa fuktighet

19. Kammarens temperatur bör upprätthållas vid 22 ± 3 °C. Relativ fuktighet i djurens andningsområden, gäller både enbart nos och helkroppsexponering, bör övervakas och registreras minst tre gånger under tidsperioder på upp till 4 timmar, och varje timme för kortare tidsperioder. Den relativa fuktigheten bör företrädesvis upprätthållas inom intervallet 30 till 70 %, men detta kanske inte är möjligt (t.ex. vid testning av vattenbaserade blandningar) eller inte mätbart på grund av att testkemikalien stör själva testmetoden.

Testkemikalie: Nominell koncentration

20. När det är möjligt bör den nominella koncentrationen i exponeringskammaren beräknas och registreras. Den nominella koncentrationen är massan av den genererade testkemikalien dividerad med den totala volymen av luft som passerade genom kammersystemet. Den nominella koncentrationen används inte för att karakterisera djurens exponering, men en jämförelse mellan den nominella koncentrationen och den faktiska koncentrationen ger en indikation på testsystemets genereringsprestanda, och kan därmed användas för att upptäcka genereringsproblem.

Testkemikalie: Faktisk koncentration

21. Den faktiska koncentrationen är testkemikalien koncentration i djurets andningsområde i en inhalationskammare. Faktiska koncentrationer kan erhållas genom särskilda metoder (t.ex. direkt provtagning, adsorptiva eller kemiskt reaktiva metoder, och efterföljande analytisk karakterisering) eller av icke-specifika metoder såsom gravimetrisk filteranalys. Användningen av gravimetrisk analys är endast acceptabel för pulveraerosoler bestående av en enda komponent eller aerosoler bestående av vätskor med låg flyktighet, och bör stödjas av en lämplig preklinisk studie med kemikaliespecifik karakterisering. Koncentrationen i pulveraerosoler bestående av flera komponenter kan också bestämmas genom gravimetrisk analys. Detta kräver dock analysresultat som visar att sammansättningen av luftburet material liknar startmaterialet. Om denna information inte finns tillgänglig kan det vara nödvändigt med en ny analys av testkemikalien (helst i sitt luftburna tillstånd) under loppet av studien. För medel i aerosolform som kan förångas eller sublimeras bör man kunna visa att samtliga faser uppsamlades med den valda metoden.
22. Målkoncentrationerna och de nominella och faktiska koncentrationerna ska finnas med i undersökningsrapporten, men endast de faktiska koncentrationerna används i de statistiska analyserna för att beräkna värdena för dödlig koncentration. En sats av testkemikalien ska användas, om möjligt, och provet ska lagras under sådana förhållanden att det bibehåller sin renhet, homogenitet och stabilitet. Inför starten av studien bör det finnas en beskrivning av testkemikalien som inbegriper dess renhet och, om det är tekniskt genomförbart, identitet, och kvantiteterna av identifierade föroreningar och orenheter. Detta kan visas genom, men är inte begränsat till, följande data: Retentionstid och relativ topparea, molekylvikt från masspektroskopi eller gaskromatografianalys, eller andra uppskattningar. Även om testlaboratoriet inte ansvarar för provets identitet kan det vara klokt att man i stora drag bekräftar karakteriseringen (t.ex. färg, fysisk natur etc.).
23. Exponeringsatmosfären ska hållas så konstant som möjligt och övervakas kontinuerligt och/eller intermittent beroende på analysmetoden. När intermittent provtagning används bör prover på kammaratmosfären tas minst två gånger under en fyratimmarsstudie. Om det inte är möjligt på grund av begränsade luftflöden eller låga koncentrationer, kan ett prov tas under hela exponeringsperioden. Om märkta prov-till-prov-fluktationer förekommer, bör man för de påföljande koncentrationerna som ska testas ta fyra prover per exponering. Provtagning av koncentrationer från individuella kammare bör inte avvika från den genomsnittliga koncentrationen med mer än ± 10 % för gaser och ångor eller ± 20 % för flytande eller fasta aerosoler. Tiden tills kammaren når jämvikt (t_{95}) bör beräknas och registreras. Varaktigheten för en exponering spänner sig över den tid som testkemikalien genereras och tar hänsyn till den tid som krävs för att uppnå t_{95} . Riktlinjer för att uppskatta t_{95} finns i GD 39 (2).
24. För mycket komplexa blandningar bestående av gaser/ångor och aerosoler (t.ex. förbränningsatmosfärer och testkemikalier framdrivna från därför avsedd slutanvändningsprodukt/-utrustning). Varje fas kan bete sig annorlunda i en inhalationskammare så minst en indikatorsubstans ska väljas (analyt), vanligtvis den huvudsakliga aktiva substansen i blandningen för varje fas (gas/ånga och aerosol). När testkemikalien är en blandning ska den analytiska koncentrationen i blandningen rapporteras, inte bara den aktiva substansen eller komponenten (analyten). Ytterligare information om faktisk koncentration finns i GD 39 (2).

Testkemikalie: Partikelstorleksfördelning

25. Aerosolers partikelstorleksfördelning bör fastställas minst två gånger under varje 4-timmars exponering med hjälp av en kaskadimpaktor eller ett alternativt instrument såsom en aerodynamisk partikelsorterare. Om man kan visa ett likvärdigt resultat från en kaskadimpaktor eller det alternativa instrumentet, kan man använda det sistnämnda under hela försöket. En andra enhet, till exempel ett gravimetriskt filter eller en impinger/gasbubblare, bör användas parallellt med det primära instrumentet för att bekräfta uppsamlingsprestandan hos det primära instrumentet. Masskoncentrationen som erhållits genom analys av partikelstorleken ska ligga inom rimliga gränser för den masskoncentration som erhållits genom filteranalys (se GD 39 (2)). Om likvärdigheten kan påvisas i ett tidigt skede av försöket kan ytterligare bekräftande mätningar utelämnas. Av djurskyddsskäl bör åtgärder vidtas för att minimera ofullständiga uppgifter som kan leda till en upprepning av exponeringen. Partikeldimensionering bör utföras för ångorna, om det finns en möjlighet att kondensen kan bilda en aerosol, eller om partiklar upptäcks i ångatmosfären som kan göra så att faserna blandas (se punkt 15).

PROCEDUR

26. Två studietyper beskrivs nedan: det traditionella protokollet och $k \times t$ -protokollet. Båda protokollen kan inkludera en inledande studie, en huvudstudie och/eller ett toleranstest (traditionellt protokoll), eller testning av en gränskoncentration ($k \times t$). Om det ena könet är känt för att vara mer mottagligt kan försöksledaren välja att utföra studierna med enbart det mottagliga könet. Om andra gnagare än råttor utsätts för enbart nos, kan de maximala exponeringstiderna justeras för att minska artspecifikt lidande. Innan försöket påbörjas ska alla tillgängliga data beaktas för att minimera djuranvändningen. Till exempel kan data som genereras genom användning av kapitel B.52 i denna bilaga (4) eliminera behovet av en inledande studie, och kan också visa om ett kön är mer mottagligt (se GD 39 (2)).

TRADITIONELLT PROTOKOLL**Allmänna överbåganden: Traditionellt protokoll**

27. I en traditionell studie exponeras grupper av djur för testkemikalier under en fast tidsperiod (vanligtvis 4 timmar) i antingen en exponeringskammare för enbart nos eller en helkroppskammare. Djuren exponeras antingen för en begränsad koncentration (toleranstest) eller för minst tre koncentrationer i ett stegvist förfarande (huvudstudie). En inledande studie kan föregå en huvudstudie om det inte redan finns någon information om testkemikalien, såsom en tidigare utförd B.52-studie (se GD 39 (2)).

Inledande studie: Traditionellt protokoll

28. En inledande studie används för att uppskatta testkemikalienens potens, identifiera könsskillnader beträffande mottaglighet, och för att välja nivå på exponeringskoncentrationen för huvudstudien eller toleranstestet. När man väljer nivå på koncentrationen för den inledande studien ska alla tillgängliga data användas, inklusive tillgängliga (Q)SAR-data och data för liknande kemikalier. Inte fler än tre hanar och tre honor ska exponeras för varje koncentration (3 djur per kön kan behövas för att fastställa en könsskillnad). En inledande studie kan bestå av en engångskoncentration, men fler koncentrationer kan testas vid behov. En inledande studie ska inte testa så många djur och koncentrationer att det liknar en huvudstudie. En tidigare utförd B.52-studie (4) kan användas i stället för en inledande studie (se GD 39 (2)).

Toleranstest: Traditionellt protokoll

29. Ett toleranstest används när testkemikalien är känd eller förväntas vara praktiskt taget icke-toxisk, dvs. framkalla en toxisk reaktion endast över den regulatoriska gränskoncentrationen. I ett toleranstest exponeras en enda grupp bestående av tre hanar och tre honor för testkemikalien vid en koncentrationsgräns. Information om testkemikalienens toxicitet kan erhållas genom kunskap om liknande testade kemikalier, med beaktande av identitet och procentandel av komponenter kända för en signifikant toxicitet. I situationer när det finns lite eller ingen information om dess toxicitet, eller testkemikalien förväntas vara toxisk, ska huvudtestet utföras.
30. Valet av koncentrationsgräns är vanligtvis beroende av regulatoriska krav. När förordning (EG) nr 1272/2008 används, är respektive koncentrationsgräns för gaser, ångor och aerosoler 20 000 ppm, 20 mg/l och 5 mg/l (eller den maximalt uppnåeliga koncentrationen) (3). Det kan vara tekniskt utmanande att generera koncentrationsgränser för vissa kemikalier, särskilt ångor och aerosoler. När man testar aerosoler bör det primära målet vara att uppnå en andningsbar partikelstorlek (MMAD av 1–4 μm). Det är möjligt för de flesta kemikalier med en koncentration på 2 mg/l. Testning av aerosoler med högre än 2 mg/l ska endast göras om en andningsbar partikelstorlek kan uppnås (se GD 39 (2)). Förordning (EG) nr 1272/2008 avråder från testning över koncentrationsgränsen av djurskyddsskäl (3). Koncentrationsgränser ska endast övervägas om ett sådant test har en direkt relevans för skyddet av människors hälsa (3), och motivering angiven i undersökningsrapporten. När det gäller potentiellt explosiva testkemikalier bör man vara noga med att undvika förhållanden som är gynnsamma för en explosion. För att undvika onödig användning av djur ska ett test genomföras utan djur före toleranstestet, för att se till att förhållandena i kammaren kan uppnås för ett toleranstest.

31. Om mortalitet eller döende observeras vid koncentrationsgränsen kan resultaten från toleranstestet tjäna som ett inledande test för ytterligare tester vid andra koncentrationer (se huvudstudie). Om en testkemikalies fysikaliska eller kemiska egenskaper gör det omöjligt att nå koncentrationsgränsen ska den maximalt uppnåeliga koncentrationen testas. Om dödligheten är lägre än 50 % vid den maximalt uppnåeliga koncentrationen behöver inga fler tester utföras. Om koncentrationsgränsen inte kunde uppnås ska undersökningsrapporten ge en förklaring och understödande data. Om den maximalt nåbara koncentrationen för en ånga inte framkallar toxicitet kan det bli nödvändigt att generera testkemikalien som en flytande aerosol.

Huvudstudie: Traditionellt protokoll

32. En huvudstudie utförs normalt med fem hanar och fem honor (eller 5 djur av det mottagliga könet, om detta är känt) per koncentrationsnivå, med minst tre koncentrationsnivåer. För att uppnå en gedigen statistisk analys ska tillräckliga koncentrationsnivåer användas. Tidsintervallet mellan exponeringsgrupperna fastställs genom start, varaktighet och allvarlighetsgrad för tecknen på toxicitet. Exponering av djur vid nästa koncentrationsnivå ska fördröjas tills det finns rimlig anledning att anta att tidigare testade djur överlever. Detta gör att försöksledaren kan justera mållkoncentrationen för nästa exponeringsgrupp. På grund av att man behöver sofistikerad teknik är detta inte alltid praktiskt genomförbart i inhalationsstudier, därför bör djurens exponering baseras på tidigare erfarenheter och vetenskapliga bedömningar. Man bör konsultera GD 39 (2) vid testning av blandningar.

PROTOKOLL FÖR KONCENTRATION \times TID ($K \times T$)

Allmänna överväganden: $k \times t$ -protokoll

33. En stegvis $k \times t$ -studie kan övervägas som ett alternativ till ett traditionellt protokoll vid bedömning av inhalationstoxicitet (12) (13) (14). Detta tillvägagångssätt låter djuren exponeras för en testkemikalie på flera koncentrationsnivåer och med olika varaktigheter. Samtliga tester utförs i en enbart nos-kammare (helkroppskammare är inte praktiska för detta protokoll). Ett flödesdiagram i tillägg 1 belyser detta protokoll. En simuleringsanalys har visat att det traditionella protokollet och $k \times t$ -protokollet båda är kapabla att ge gedigna LC_{50} -värden, men $k \times t$ -protokollet är generellt bättre på att ge gedigna LC_{01} - och LC_{10} -värden (15).
34. En simuleringsanalys har visat att användningen av två djur per $k \times t$ -intervall (ett per kön vid användning av båda könen eller två av det mer mottagliga könet) i allmänhet kan vara tillräckligt när man testar 4 koncentrationer och 5 exponeringsvaraktigheter i en huvudstudie. Under vissa omständigheter kan försöksledaren välja att använda två råttor per kön per $k \times t$ -intervall (15). Att använda 2 djur per kön per koncentration och tidpunkt kan minska förutfattade meningar angående uppskattningarnas variation, öka framgångsgraden och förbättra konfidensintervallets täckning. I händelse av att resultatet inte ligger tillräckligt nära uppskattningsdatan (vid användning av ett djur per kön eller två av det mer mottagliga könet) kan dock även en 5:e koncentrationsexponering räcka. Ytterligare vägledning om antalet djur och koncentrationer som ska användas i en $k \times t$ -studie finns i GD 39 (2).

Inledande studie: $k \times t$ -protokoll

35. En inledande studie används för att uppskatta testkemikaliesensitens och underlätta valet av exponeringens koncentrationsnivåer för huvudstudien. En inledande studie som använder upp till tre djur per kön och koncentration (beträffande detaljer se tillägg III till GD 39 (2)) kan behöva välja en lämplig startkoncentration till huvudstudien för att minimera antalet djur som används. Det kan vara nödvändigt att använda tre djur per kön för att fastställa en könsskillnad. Dessa ska exponeras för en enstaka tidsperiod, vanligtvis 240 min. Möjligheten att generera adekvata testatmosfärer bör utvärderas vid tekniska förtester utan djur. Vanligtvis behöver man inte genomföra en inledande studie om det finns tillgängliga mortalitetsdata från en B.52-studie (4). När man väljer den inledande mållkoncentrationen i en B.2-studie bör försöksledaren beakta mortalitetsmönstret som observerats i eventuella tillgängliga B.52-studier (4) för båda könen och för alla testade koncentrationer (se GD 39 (2)).

Inledande koncentration: $k \times t$ -protokoll

36. Den inledande koncentrationen (exponeringssession 1) (tillägg 1) är antingen en gränskoncentration eller en koncentration vald av försöksledaren baserad på den inledande studien. Grupper om 1 djur per kön exponeras för den här koncentrationen under flera tidsperioder (t.ex. 15, 30, 60, 120 eller 240 minuter) vilket resulterar i ett totalt antal av 10 djur (vilket kallas exponeringssession I) (tillägg 1).
37. Valet av koncentrationsgräns är vanligtvis beroende av regulatoriska krav. När förordning (EG) nr 1272/2008 används, är respektive koncentrationsgräns för gaser, ångor och aerosoler 20 000 ppm, 20 mg/l och 5 mg/l (eller den maximalt uppnåeliga koncentrationen) (3). Det kan vara tekniskt utmanande att generera koncentrationsgränser för vissa kemikalier, särskilt ångor och aerosoler. Vid testning av aerosoler bör målet vara att uppnå en inandningsbar partikelstorlek (dvs. en MMAD på 1–4 μ m) vid en koncentrationsgräns på 2 mg/l. Detta är möjligt för de flesta testkemikalier. Testning av aerosoler med mer än 2 mg/l bör endast utföras om en andningsbar partikelstorlek kan uppnås (se GD 39 (2)). Förordning (EG) nr 1272/2008 avråder från testning över koncentrationsgränsen av djurskyddsskal (3). Testning över koncentrationsgränsen ska endast övervägas när ett sådant test har en direkt relevans för skyddet av människors hälsa (3), motiveringen ska anges i undersökningsrapporten. När det gäller potentiellt explosiva testkemikalier bör man vara noga med att undvika

förhållanden som är gynnsamma för en explosion. För att undvika onödig djuranvändning ska ett test genomföras utan djur före testningen med den inledande koncentrationen för att säkerställa att förhållandena i kammaren kan uppnås för denna koncentration.

38. Om mortalitet eller döende observeras vid den inledande koncentrationen kan resultaten från denna koncentration tjäna som en inledande studie för ytterligare tester vid andra koncentrationer (se huvudstudie). När en testkemikalies fysikaliska eller kemiska egenskaper gör det omöjligt att nå koncentrationsgränsen ska den maximalt uppnåeliga koncentrationen testas. Om dödligheten är lägre än 50 % vid den maximalt uppnåeliga koncentrationen behöver inga fler tester utföras. Om koncentrationsgränsen inte kunde uppnås ska undersökningsrapporten ge en förklaring och understödande data. Om den maximalt nåbara koncentrationen för en ämne inte framkallar toxicitet kan det bli nödvändigt att generera testkemikalien som en flytande aerosol.

Huvudstudie: k × t-protokoll

39. Den inledande koncentrationen (exponeringssession 1) (tillägg 1) som testas i huvudstudien är antingen en gränskoncentration eller en koncentration vald av försöksledaren baserad på den inledande studien. Om mortalitet har observerats under eller efter exponeringssession 1 kommer den minsta exponering (k × t) som leder till mortalitet att användas som riktlinje för fastställande av koncentration och exponeringsperiod för exponeringssession II. Varje efterföljande exponeringssession bygger på den föregående (se tillägg 1).
40. För många testkemikalier är det resultat som erhålls vid den initiala koncentrationen, tillsammans med ytterligare tre exponeringssessioner med ett mindre tidsrutssystem (dvs. det geometriska mellanrummet för exponeringsperioder som anges av faktorn mellan på varandra följande perioder, i allmänhet $\sqrt{2}$), tillräckligt för att fastslå k × t-dödlighetsförhållandet (15), men det kan finnas vissa fördelar med att använda en 5:e exponeringskoncentration (se tillägg 1 och GD 39 (2)). För matematisk behandling av resultaten från k × t-protokollet, se tillägg 1.

IAKTTAGELSER

41. Djuren bör ofta observeras kliniskt under exponeringsperioden. Efter exponeringen ska kliniska observationer göras minst två gånger på dagen för exponeringen, eller oftare om djurens respons på behandlingen indikerar det, och därefter minst en gång per dag under en period av 14 dagar. Observationstidens längd är inte fast, utan bör bestämmas utifrån art och tidpunkt för de första kliniska tecknen samt längden på återhämningsperioden. De tillfällen då tecken på toxicitet uppträder och försvinner är viktiga, särskilt om tecknen på toxicitet visar en tendens att fördröjas. Alla observationer registreras systematiskt med individuella registreringar för varje djur. Djur som påträffas döende och djur som visar tecken på uppenbar smärta och/eller svårt ihållande lidande ska avlivas skonsamt av djurskyddsskäl. Försiktighet bör iaktas vid utförande av undersökningar för kliniska tecken på toxicitet, så att djur som ser dåliga ut och har övergående respiratoriska förändringar till följd av exponeringsförfarandet, inte misstas för testkemikalierelaterad toxicitet som kräver förtida avlivande av djuren. Principerna och kriterierna som finns sammanfattade i vägledningsdokumentet om humana endpoints (GD 19) bör tas i beaktande (7). När djur avlivas av humanitära skäl eller påträffas döda, ska tidpunkten för dödsfallet registreras så noggrant som möjligt.
42. Observationer vid buren bör omfatta förändringar i bur och päls, ögon och slemhinnor, samt även andningsorganen, cirkulationsorganen och det autonoma och centrala nervsystemet, samt kroppsmotorik och beteendemönster. Om möjligt bör eventuella skillnader mellan lokala och systematiska effekter noteras. Uppmärksamhet bör fästas vid observationer av tremor, konvulsioner, salivutsöndring, diarré, letargi, sömn och koma. Mätningen av rektal temperatur kan ge belägg för bradypnéreflex eller hypo/hypertermi relaterat till behandling eller inspärning.

Kroppsvikt

43. Vikten på individuella djur bör registreras en gång under aklimatiseringsperioden på exponeringsdagen före exponeringen (dag 0), och åtminstone dag 1, 3 och 7 (och därefter varje vecka), och vid tidpunkten då döden eller avlivningen inträffar om dag 1 överskrids. Kroppsvikt är en erkänt viktig indikator på toxicitet, så djur som uppvisar en fortsatt minskning på ≥ 20 % jämfört med värdena i förstudien bör noggrant övervakas. Djur som överlever vägs och avlivas skonsamt i slutet av perioden efter exponeringsperioden.

Patologi

44. Alla försöksdjur, inklusive de som avlider under testet eller avlivas och tas bort från undersökningen av djurskyddsskäl bör obduceras. Om en obduktion inte kan utföras omedelbart efter att ett dött djur har upptäckts, bör djuret kylas (inte frysas) vid en temperatur som är tillräckligt låg för att minimera autolys. Obduktioner ska utföras så snart som möjligt, vanligtvis inom en dag eller två. Alla betydande patologiska förändringar bör registreras för varje djur med särskild uppmärksamhet på eventuella förändringar i luftvägarna.

45. Ytterligare undersökningar inklusive a priori genom beräkning kan anses utöka studiens tolkningsvärde, såsom mätning av lungvikt hos överlevande råttor, och/eller ge prov på irritation genom den mikroskopiska undersökningen av luftvägarna. Undersökta organ kan också innefatta sådana som uppvisar betydande skador och som härrör från djur som överlevt 24 timmar eller mer, och organ kända för, eller som förväntas, att påverkas. Mikroskopisk undersökning av hela luftvägarna kan ge användbar information om testkemikalier som är reaktiva med vatten, såsom syror och hyroskopiska testkemikalier.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

46. Individuella data om kroppsvikt och obduktionsfynd bör tillhandahållas. Kliniska observationsdata bör sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antalet djur som använts, antalet djur som visar tecken på toxicitet, antalet djur som avlidit under testet eller som avlivats av humanitära skäl, tidpunkten då det enskilda djuret har avlidit, beskrivning och tidsförlopp för toxiska verkningar och reversibilitet, samt obduktionsfynd.

Testrapport

47. Testrapporten ska omfatta följande information, när så är lämpligt:

Försöksdjur och djurhållning

- Beskrivning av burförhållanden, inklusive antal (eller förändring av antal) djur per bur, strö, omgivningstemperatur och relativ fuktighet, ljusperiod och identifiering av kost.
- Art/stam som används och motivering för användning av andra arter än råtta.
- Djurens antal, ålder och kön.
- Metod för randomisering.
- Uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet kosttyp/-källa och vattenförsörjning).
- Beskrivning av eventuella förtestbetingelser inbegripet kost, karantän och behandling av sjukdomar.

Testkemikalie

- Fysikalisk natur, renhet och, i förekommande fall, fysikalisk-kemiska egenskaper (inbegripet isomerisering).
- Identifieringsdata och CAS-nummer (Chemical Abstract Services), om detta är känt.

Vehikel

- Motivering för användning av vehikel och valet av vehikel (om annat än vatten).
- Historiska eller parallella data som visar att vehikeln inte påverkar studiens slutresultat.

Inhalationskammare

- Beskrivning av inhalationskammaren inklusive mått och volym.
- Ursprung och beskrivning av utrustning som används för exponering av djur så väl som generering av atmosfär.
- Utrustning för mätning av temperatur, fuktighet, partikelstorlek och faktisk koncentration.

- Luftkälla och behandling av luft som tillförs/extraheras och system som används för luftkonditionering.
- Metoder som används för kalibrering av utrustning för att säkerställa en homogen testatmosfär.
- Tryckskillnad (positiv eller negativ).
- Exponeringsportar per kammare (enbart nos), placering av djur i systemet (helkropp).
- Temporal homogenitet/stabilitet för testatmosfären.
- Placering av temperatur- och fuktighetsgivare och provtagning av testatmosfären i kammaren.
- Luftflödes hastigheter, port för luftflöde och exponering (enbart nos), eller djurbelastning och kammare (helkropp).
- Information om utrustningen som används för att mäta syre och koldioxid, i förekommande fall.
- Tid som krävs för att uppnå jämvikt i inhalationskammaren (t_{95}).
- Antal volymutbyten per timme.
- Mätutrustning (i förekommande fall).

Exponeringsdata

- Grunden för valet av målkoncentration i huvudstudien.
- Nominella koncentrationer (den totala massan av testkemikalien som genereras i inhalationskammaren dividerad med luftvolymen som passerar genom kammaren).
- Faktiska koncentrationer av testkemikalier som uppsamlats från djurens andningsapparat, för blandningar som bildar heterogena fysikaliska former (gaser, ångor, aerosoler), där var och en analyseras separat.
- Alla luftkoncentrationer ska rapporteras i viktenheter (t.ex. mg/l, mg/m³, etc.). Enheter för volym (t.ex. ppm, ppb etc.) kan också redovisas inom parantes.
- Partikelstorleksfördelning, aerodynamisk massmediandiameter (MMAD) och geometrisk standardavvikelse (σ), inklusive metoderna för deras beräkning. Individuella partikelstorleksanalyser bör rapporteras.

Testbetingelser

- Uppgifter om beredning av testkemikalien, inklusive uppgifter om eventuella procedurer som använts för att minska partikelstorleken hos fasta material eller för att bereda testlösningar. I de fall där mekaniska processer kan ha förändrat testkemikaliens sammansättning ska analysresultaten inkluderas för att bekräfta dess sammansättning.
- En beskrivning (helst med ett diagram) av utrustningen som används för att generera testatmosfären och exponera djuren för denna atmosfär.
- Uppgifter om den kemiska analysmetod som använts och metodvalidering (inklusive effektiviteten för återvinningen av testkemikalien från provtagningsmediet).
- Grunden för valet av testkoncentration.

Resultat

- Tabelluppställning av kammarens temperatur, fuktighet och luftflöde.
- Tabelluppställning av kammarens nominella och faktiska koncentrationsdata.
- Tabelluppställning av partikelstorleksdata som omfattar provtagningsdata, partikelstorleksfördelning och beräkning av MMAD och σ_g .
- Tabelluppställning av responsdata och koncentrationsnivåer för varje djur (dvs. djur som uppvisar tecken på toxicitet inklusive mortalitet, natur, allvarlighetsgrad, tidpunkt för första tecknet och effekternas varaktighet).
- Djurens individuella kroppsvikt som samlats in under studien, datum och tid för dödsfall som inträffat före planerad avlivning, tidsförlopp för första tecknen på toxicitet och om dessa var reversibla för varje enskilt djur.
- Obduktionsfynd och histopatologiska fynd för varje djur, om detta finns tillgängligt.
- Dödlighetsuppskattning (t.ex. LC₅₀, LD₀₁) inklusive 95 % konfidensgräns, och lutning (om det tillhandahålls av utvärderingsmetoden).
- Statistisk relation, inklusive uppskattningen av exponenten n (k × t-protokoll). Namnet på den statistiska programvara som används bör tillhandahållas.

Diskussion och tolkning av resultaten

- Särskild uppmärksamhet bör ges till beskrivningen av använda metoder för att uppfylla kriterierna för den här testmetoden, t.ex. koncentrationsgräns eller partikelstorlek.
- Partiklarnas andningsbarhet i ljuset av de övergripande resultaten bör åtgärdas, särskilt om kriterierna för partikelstorlek inte kunde uppfyllas.
- En förklaring bör ges om det fanns ett behov av att avliva djur av humanitära skäl som visade tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande, på grundval av kriterierna i OECD:s vägledningsdokument om humana endpoints (8).
- Om testning enligt kapitel B.52 i denna bilaga (4) avbröts till förmån för testmetod B.2, bör motivering för detta lämnas.
- Överensstämmelsen mellan metoderna som används för att bestämma nominell och faktisk koncentration, och förhållandet mellan faktisk och nominell koncentration bör ingå i den samlade bedömningen av studien.
- Den sannolika dödsorsaken och dominerande verkningsmekanism (systematisk mot lokal) bör behandlas.

LITTERATUR

- (1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Finns på <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
- (2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Finns på <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
- (3) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006 (EUT L 353, 31.12.2008, s. 1).
- (4) Kapitel B.52 i denna bilaga, akut inhalationstoxicitet – akut toxicitetsklass.

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

DEFINITION

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

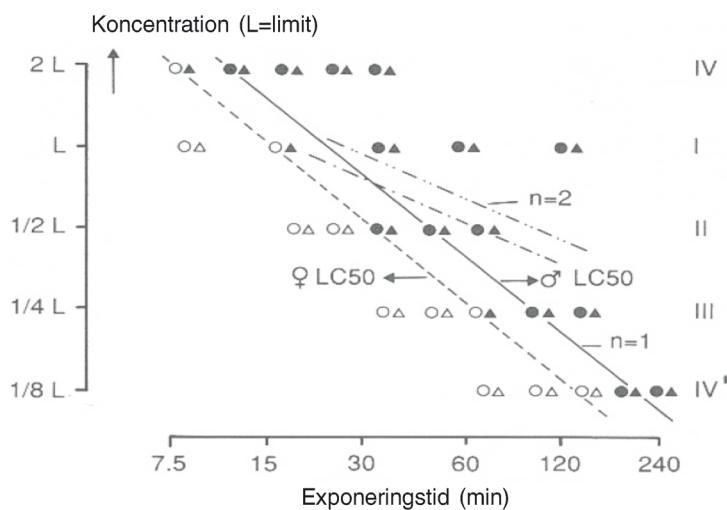
Tillägg 1

K × t-protokoll

1. En stegvis koncentration × tid-studie (k × t) kan övervägas som ett alternativ till det traditionella protokollet för bedömning av inhalationstoxicitet (12) (13) (14). Den bör företrädesvis utföras när det finns ett specifikt regelverk eller vetenskapligt behov som kräver testning av djur under flera tidsperioder, såsom katastrofhanterings- eller markanvändningsplanering. Detta tillvägagångssätt börjar med ett test vid en koncentrationsgräns (exponeringssession 1) i vilka djuren exponeras för en testkemikalie under fem tidsperioder (t.ex. 15, 30, 60, 120 och 240 minuter) så att flera löptider kommer att erhållas inom en exponeringssession (se figur 1). När förordning (EG) nr 1272/2008 används, är respektive koncentrationsgräns för gaser, ångor och aerosoler 20 000 ppm, 20 mg/l och 5 mg/l. Dessa nivåer kan endast överskridas om det finns ett specifikt regelverk eller vetenskapligt behov som kräver testning vid dessa nivåer (se punkt 37 i B.2 i huvudtexten).
2. I situationer där det finns lite eller ingen information om en testkemikalies toxicitet, bör en inledande studie utföras, i vilken grupper om maximalt 3 djur per kön exponeras för de målkoncentrationer som försöksledaren har valt, vanligtvis i 240 minuter.
3. Om en koncentrationsgräns testas under exponeringssession 1 och lägre mortalitet än 50 % observeras, behövs inga ytterligare tester utföras. Om det finns ett regelverk eller vetenskapligt behov av att fastställa förhållandet koncentration/tid/respons för högre nivåer än den angivna koncentrationsgränsen bör nästa exponering utföras vid en högre nivå som t.ex. två gånger koncentrationsgränsen (dvs. 2 L i figur 1).
4. Om toxicitet observeras vid koncentrationsgränsen behöver ytterligare tester utföras (huvudstudie). Dessa exponeringar utförs antingen vid lägre koncentrationer (i figur 1: exponeringssession II, III eller IV) eller högre koncentrationer med kortare varaktigheter (i figur 1: exponeringssession IV) med anpassade tidsperioder som inte är så vitt åtskilda.
5. Testet (inledande koncentration och ytterligare koncentrationer) utförs med 1 djur/kön per koncentration/tidpunkt eller med 2 djur av det mer mottagliga könet per koncentration/tidpunkt. Under vissa omständigheter kan försöksledaren välja att använda 2 råttor per kön per koncentration/tidpunkt (eller 4 djur av det mer mottagliga könet per koncentration/tidpunkt) (15). Att använda 2 djur per kön per koncentration och tidpunkt kan generellt minska förutfattade meningar angående uppskattningarnas variation, öka framgångsgraden och förbättra konfidensintervallets täckning i förhållande till det protokoll som beskrivs här. Mer information finns i GD 39 (2).
6. Helst ska varje exponeringssession genomföras på en dag. Detta ger möjlighet att fördröja nästa exponering tills det finns en rimlig garanti för överlevnad, och det gör att försöksledaren kan justera målkoncentrationen och tidsperioden för nästa exponeringssession. Det rekommenderas att börja varje exponeringssession med den grupp som kommer att exponeras längst, t.ex. gruppen för exponering i 240 minuter följt av den som exponeras i 120 minuter, och så vidare. Om, till exempel, djur i 240-minutersgruppen dör efter 90 minuter eller uppvisar allvarliga tecken på toxicitet (t.ex. extrema förändringar i andningsmönster såsom ansträngd andning) är det inte meningsfullt att utsätta en grupp för 120 minuter eftersom dödligheten sannolikt skulle vara 100 %. Därför bör försöksledaren välja kortare exponeringstider för den koncentrationen (t.ex. 90, 65, 45, 33 och 25 minuter).
7. Kammarrens koncentration bör mätas ofta för att bestämma den tidsviktade genomsnittskoncentrationen för varje exponeringsvaraktighet. När det är möjligt bör tidpunkten för dödsfallet för varje djur (snarare än exponeringsvaraktighet) användas för den statistiska analysen.
8. Man bör se närmare på resultaten från de fyra första exponeringssessionerna för att identifiera luckor i koncentration-tidskurvan (se figur 1). Vid en otillräcklig tillpassning bör en ytterligare exponering (5:e koncentration) genomföras. Koncentrations- och exponeringsvaraktigheter för den 5:e exponeringen bör väljas för att täcka denna lucka.
9. Alla exponeringssessioner (inklusive den första exponeringssessionen) används för att beräkna förhållandet koncentration-tid-respons med hjälp av statistisk analys (16). Om det är möjligt ska för varje k × t-intervall det tidsviktade medelvärde och exponeringsvaraktigheten fram till döden användas (om dödsfallet inträffar under exponeringen).

Figur 1

Hypotetisk illustration av förhållandet koncentration-tid-mortalitet för råttor



Ofyllda symboler = överlevande; fyllda symboler = döda djur

Trianglar = honor; cirklar = hanar

Heldragen linje = LC₅₀-värden (7,5–240 min) för hanar med n = 1

Streckad linje = LC₅₀-värden (7,5–240 min) för honor med n = 1

Prickad linje = hypotetiska LC₅₀-värdeslinjer för hanar och honor om n hade varit lika med 2 (12).

Ordförklaringar

Koncentration:

Exponeringstid:

10. Nedan finns ett exempel på ett stegvist förfarande:

Exponeringssession 1 – testning vid koncentrationsgräns (se figur 1)

- 1 djur/kön per koncentration/tidpunkt, totalt ^(a)
- Målkoncentration ^(b) = koncentrationsgräns.
- Exponera fem grupper av djur för denna målkoncentration för respektive varaktighet 15, 30, 60, 120 och 240 minuter.

↓

Exponeringssession II ^(c) – huvudstudie

- 1 djur/kön per koncentration/tidpunkt, totalt 10 djur.

^(a) Om det inte finns någon information tillgänglig om könsmottaglighet används råttor av båda könen, dvs. 1 djur/kön per koncentration. Baserat på befintlig information eller om det blir uppenbart under denna exponeringssession att ett kön är mer mottagligt, används 10 djur av det mer mottagliga könet (2 djur per koncentration/tidpunkt) för varje koncentrationsnivå under efterföljande testning. 10 djur

^(b) När förordning (EG) nr 1272/2008 används, är respektive koncentrationsgräns för gaser, ångor och aerosoler 20 000 ppm, 20 mg/l och 5 mg/l. Vid förväntad toxicitet, eller baserat på resultaten från det inledande testet, bör lägre startkoncentrationer väljas. I fall av regulatoriska eller vetenskapliga behov kan högre koncentrationer användas.

^(c) Helst ska exponering av djur vid nästa koncentrationsnivå fördröjas tills det finns rimlig anledning att anta att de tidigare testade djuren överlever. Detta gör att försöksledaren kan justera målkoncentration och varaktighet för nästa exponeringssession.

- Exponera fem grupper av djur vid en lägre koncentration ^(d) (1/2 l) med något längre exponeringsvaraktigheter (faktor $\sqrt{2}$ utspritt; se figur 1).

↓

Exponeringssession III – huvudstudie

- 1 djur/kön per koncentration/tidpunkt, totalt 10 djur.
- Exponera fem grupper av djur vid en lägre koncentration ^(d) (1/4 l) med något längre exponeringsvaraktigheter (faktor $\sqrt{2}$ utspritt; se figur 1).

↓

Exponeringssession IV' – huvudstudie

- 1 djur/kön per koncentration/tidpunkt, totalt 10 djur.
- Exponera fem grupper av djur vid en lägre koncentration ^(d) (1/8 l) med något längre exponeringsvaraktigheter (faktor $\sqrt{2}$ utspritt; se figur 1).

↓ eller

Exponeringssession IV – huvudstudie

- 1 djur/kön per koncentration/tidpunkt, totalt 10 djur.
- Exponera fem grupper av djur vid en högre koncentration ^(e) (2 l) med något kortare exponeringsvaraktigheter (faktor $\sqrt{2}$ utspritt; se figur 1).

Matematisk behandling av resultaten för k × t-protokollet

11. Ett k × t-förfarande med 4 eller 5 exponeringskoncentrationer och fem varaktigheter ger 20 respektive 25 datapunkter. Med dessa datapunkter kan k × t-förhållandet beräknas med hjälp av statistisk analys (16):

Ekvation 1:

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

där C = koncentration; t = exponeringstid, eller

Ekvation 2:

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

där n = b_1/b_2 .

Med hjälp av ekvation 1 kan LC₅₀-värdet beräknas för en given tidsperiod (t.ex. 4 timmar, 1 timme, 30 minuter eller valfri tidsperiod inom intervallet för testets tidsperioder) med P = 5 (50 % respons). Observera att Habers lag endast är tillämplig när n = 1. LC₀₁ kan beräknas med hjälp av P = 2,67.

^(d) Den minsta dosering (koncentration × tid) som resulterade i mortalitet vid den inledande koncentrationen (första exponeringssessionen) gäller som vägledning för att fastställa nästa kombination av koncentration och exponeringsvaraktighet. Normalt minskas koncentrationen tvåfaldigt (1/2 l) och djuren exponeras under ett nytt tidsintervall med ett finare rutnät av geometrisk uppdelning av exponeringsperioder med faktor 1,4 ($\sqrt{2}$; se hänvisning 11) runt tiden för den minsta letala dosnivån (tid × koncentration) som observerades under den första exponeringen. I denna figur (figur 1), observerades mortalitet först i exponeringssession I efter 15 min., varaktigheterna under session II centreras därför omkring 30 min., och är 15, 21, 30, 42 och 60 min. Efter de första två exponeringarna rekommenderas att plotta datan i en liknande figur som visas ovan, och att kontrollera att förhållandet mellan koncentration och tid har en vinkel på 45 grader (n = 1), eller om förhållandet koncentration-tid-respons är mindre brant (t.ex. n = 2) eller brantare (t.ex. n = 0,8). I de senare fallen rekommenderas det att anpassa efterföljande koncentrationer och varaktigheter enligt detta.

^(e) I vissa fall kan det vara nödvändigt att öka koncentrationen (2 l) under ett nytt tidsintervall med ett ännu finare rutnät av geometrisk uppdelning av exponeringsperioder med faktor 1,4 ($\sqrt{2}$) omkring tiden för den minsta letala koncentrationnivån som observerades under den första exponeringen. Den minsta exponeringstiden bör helst överstiga 5 minuter, den maximala exponeringstiden bör inte överstiga 8 timmar.*

(4) Kapiteln B.7 och B.8 ska ersättas med följande:

"B.7 28-DAGARS TOXICITETSSTUDIE MED UPPREPAD ORAL DOSERING PÅ GNAGARE

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje 407 (2008). Den ursprungliga testriktlinjen 407 antogs 19.8.1995 antogs en reviderad version för att erhålla ytterligare information från djuret som används i studien, i synnerhet om neurotoxicitet och immuntoxicitet.
2. 1998 inledde OECD en högprioriterad verksamhet för att se över befintliga testriktlinjer och utveckla nya riktlinjer för undersökning och testning av potentiellt endokrin-störande ämnen (8). Ett inslag i verksamheten var att uppdatera befintlig OECD-riktlinje för "28-dagars toxicitetsstudie med upprepad oral dosering på gnagare" (TG407) med parametrar lämpliga för att upptäcka endokrin aktivitet för testkemikalier. Denna procedur genomgick ett omfattande internationellt program för att testa relevansen och tillämpbarheten av de kompletterande parametrarna, utförandet av dessa parametrar för kemikalier med (anti) östrogen-, (anti) androgen- och (anti) köldkörtelaktivitet och reproducerbarhet inom och mellan laboratorier samt de nya parametrarnas interferens med de som krävdes i den tidigare TG 407. Den stora mängden data som därvid erhöles har sammanställts och utvärderats i detalj i en omfattande OECD-rapport (9). Den här uppdaterade testmetoden B.7 (som är likvärdig med TG 407) är resultatet av de erfarenheter och resultat som uppnåddes under det internationella testprogrammet. Med den här testmetoden kan vissa endokrina indirekta verkningar sättas i samband med andra toxikologiska verkningar.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

3. Vid bedömningen och utvärderingen av de toxiska egenskaperna hos en kemikalie kan bestämningen av toxicitet med upprepad oral dosering genomföras efter att inledande information om toxicitet har erhållits genom testning av akut toxicitet. Avsikten med den här testmetoden är att undersöka effekterna på ett mycket brett spektrum av potentiella måltavlor för toxicitet. Den ger information om eventuella hälsorisker som kan uppstå vid upprepad exponering under en relativt begränsad tidsperiod, inklusive effekterna på nervsystemet, immunsystemet och det endokrina systemet. Vad beträffar dessa speciella endpoints, bör den identifiera kemikalier med neurotoxisk verkan, vilket kan motivera mer ingående undersökningar av denna aspekt, samt kemikalier som påverkar sköldkörtelns fysiologi. Den kan också tillhandahålla data om kemikalier som påverkar de manliga och/eller kvinnliga könsorganen hos unga vuxna djur samt ge indikationer på immunologiska effekter.
4. Resultaten från denna testmetod B.7 bör användas för faroidentifiering och riskbedömning. Resultaten som erhöles genom de endokrinrelaterade parametrarna bör sättas i samband med "OECD:s ramverk för testning och bedömning av endokrin-störande kemikalier" (11). Metoden innefattar den grundläggande toxicitetsstudien med upprepad dosering som kan användas för kemikalier för vilka en 90-dagarsstudie inte är motiverad (t.ex. när produktionsvolymen inte överskrider vissa gränser) eller som en inledning till en långtidsstudie. Varaktigheten för exponeringen bör vara 28 dagar.
5. Det internationella programmet som genomfördes om validering av parametrar lämpliga för upptäckt av en testkemikalies eventuella endokrina aktivitet visade att kvaliteten på datan som erhöles genom denna testmetod B.7 beror mycket på testlaboratoriets erfarenheter. Detta hänför sig särskilt till histopatologisk bestämning av cykliska förändringar i de kvinnliga fortplantningsorganen och viktbestämning av de små hormonberoende organen som är svåra att dissekera. Vägledning för histopatologi har utvecklats (19). Den finns på OECD:s offentliga webbplats om riktlinjer för testning. Den är avsedd för att hjälpa patologer i deras undersökningar och bidra till att öka analysens känslighet. En mängd olika parametrar befanns vara indikativa för endokrinrelaterad toxicitet och har införlivats i testmetoden. Parametrar för vilka det fanns tillräckliga data tillgängliga för att visa nytta eller vilka visade svaga bevis i valideringsprogrammet för deras förmåga att detektera endokrin-störande ämnen föreslås som valfria endpoints (se tillägg 2).
6. På grundval av datan som genereras i valideringsprocessen, måste det framhållas att känsligheten hos denna analys inte är tillräcklig för att identifiera alla ämnen med (anti) androgena eller (anti) östrogena verkningsätt (9). Testmetoden genomförs inte i ett livsskede som är mest känslig för endokrina störningar. Dock har testmetoden under valideringsprocessen identifierat ämnen som svagt eller starkt påverkar sköldkörtelns funktion, och starka eller måttliga endokrina aktiva ämnen som verkar genom östrogena eller androgena receptorer, men som i de flesta fall misslyckades med att identifiera endokrina aktiva ämnen som svagt påverkar östrogena eller androgena receptorer. Därför kan den inte beskrivas som en screeninganalys av endokrin aktivitet.
7. Följaktligen kan avsaknaden av verkningar relaterade till dessa verkningsmekanismer inte tas som bevis på bristen av verkningar på det endokrina systemet. Beträffande indirekta endokrina verkningar bör därför inte ämnets karakterisering baseras enbart på resultaten från denna testmetod, men bör användas i en sammanvägd bedömning som omfattar alla befintliga data om en kemikalie för att karakterisera eventuell endokrin aktivitet. Av denna anledning bör regulatoriskt beslutsfattande om endokrin aktivitet (ämneskarakterisering) vara en bred strategi, inte enbart beroende av resultaten från tillämpningen av denna testmetod.

8. Det är erkänt att alla djurbaserade förfaranden kommer att överensstämma med lokala normer för djurvård; beskrivningarna av vård och behandling som anges nedan är miniminormer för prestanda som kommer att ersättas av strängare lokala bestämmelser. Ytterligare vägledning om human behandling av djur finns i OECD (14).
9. Definitioner som används finns i tillägg 1.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

10. Testkemikalien tillförs oralt dagligen i graderade doser till flera grupper av försöksdjur, en dosnivå per grupp för en period på 28 dagar. Under administreringsperioden observeras djuren varje dag noggrant för tecken på toxicitet. Djur som dör eller avlivs under testet obduceras, och i slutet av testet avlivs överlevande djur och obduceras. En 28-dagarsstudie ger information om effekterna av upprepad oral exponering och kan indikera behovet av ytterligare långtidsstudier. Den kan också ge information om valet av koncentrationer för långtidsstudier. Datan som härrör från användningen av testmetoden ska göra det möjligt att karakterisera testkemikaliens toxicitet som en indikation på förhållandet dos-respons och bestämningen av nivån där ingen skadlig effekt observeras (NOAEL).

METODBESKRIVNING

Val av djurart

11. Rekommenderad gnagare är råttan, även om andra gnagare kan användas. En utförlig motivering ska ges om de parametrar som anges i denna testmetod B.7 undersöks i andra gnagare. Även om det är biologiskt sannolikt att andra arter bör svara på gifter på liknande sätt som råttan, kan användningen av mindre arter resultera i ökad variabilitet på grund av tekniska utmaningar att dissekera mindre organ. I det internationella valideringsprogrammet för att detektera endokrinstörande ämnen, var råttan den enda art som användes. I testet bör unga friska vuxna djur användas av stammar som vanligtvis används på laboratorier. Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga. Doseringen bör inledas snarast möjligt efter avvänjningen, och under alla förhållanden innan djuren är nio veckor gamla. Vid inledningen av studien bör viktskillnaden hos de använda djuren vara minimal och inte överstiga $\pm 20\%$ av medelvikten för varje kön. När en upprepad oral dos utförs som inledning till en långtidsstudie, är det att föredra att djur från samma stam och ursprung används för båda studierna.

Inhysning och utfodring

12. Alla förfaranden bör överensstämma med lokala normer för laboratoriedjurvård. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 % utom när rummet rengörs, bör målet vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med ljusperioden 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas med ett obegränsat utbud av dricksvatten. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie när den administreras genom denna metod. Djuren bör vara inrymda i små grupper av samma kön. Djuren kan inhysas individuellt om det är vetenskapligt motiverat. Vid gruppplacering i bur bör inte fler än fem djur inhysas per bur.
13. Fodret bör regelbundet analyseras beträffande föroreningar. Ett prov av fodret bör sparas tills rapporten är slutförd.

Förberedelse av djuren

14. Friska unga vuxna djur väljs slumpvis ut till kontroll- och behandlingsgrupperna. Burarna bör placeras så att en möjlig påverkan beroende på deras placering minimeras. Därefter identifieras djuren individuellt och får akklimatisera sig till laboratoriets betingelser i sina burar i minst fem dagar före behandlingsstudien.

Beredning av doser

15. Testkemikalien tillförs genom sondmatning eller via fodret eller dricksvattnet. Metoden för oral tillförsel är beroende av syftet med studien och de fysikaliska/kemiska/toxikologisk-kinetiska egenskaperna hos testkemikalien.
16. Vid behov kan testkemikalien upplösas eller suspenderas i en lämplig vehikel. Det rekommenderas, när så är möjligt, att man först använder en vattenbaserad lösning/suspension följt av en lösning/suspension i olja (t.ex. majsolja) och därefter eventuell lösning i andra vehiklar. För vehiklar annat än vatten måste de toxiska egenskaperna hos vehikeln vara kända. Testkemikaliens stabilitet i vehikeln bör bestämmas.

PROCEDUR

Djurens antal och kön

17. Minst 10 djur (fem honor och fem hanar) bör användas för varje doseringsnivå. Om interimistisk avlivning planeras bör antalet djur ökas med det antal som man planerar att avliva innan studien slutförs. Man bör överväga en extra satellitgrupp på tio djur (fem per kön) i kontroll- och i toppdosgruppen för observation beträffande reversibilitet, persistens eller fördröjda toxiska verkningar under minst 14 dagar efter behandlingen.

Dosering

18. I allmänhet bör minst tre testgrupper och en kontrollgrupp användas, men ett toleranstest kan utföras om man efter utvärderingen av andra data inte förväntar sig några verkningar efter en dos på 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag. Om det inte finns några lämpliga data tillgängliga kan en pilotstudie (djur av samma stam och ursprung) utföras för att underlätta bestämningen av de doser som ska användas. Med undantag av behandlingen med testkemikalien bör djuren i kontrollgruppen hanteras på exakt samma sätt som testgruppen. Om en vehikel används för att tillföra testkemikalien bör kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används.
19. Nivåerna på doserna bör väljas med hänsyn till eventuell toxicitetsdata och (toxikologisk-) kinetiska data som finns tillgängliga om testkemikalien eller liknande kemikalier. Den högsta nivån på dosen bör väljas i syfte att inducera toxiska verkningar, men inte leda till döden eller orsaka svåra lidanden. Därefter bör en fallande nivå på doserna väljas i syfte att påvisa en dosrelaterad respons och ingen påvisbar skadlig effekt vid den lägsta dosnivån (NOAEL). Två- till fyrfaldiga dosintervall är ofta optimala för de fallande dosnivåerna, och att lägga till en fjärde testgrupp är att föredra framför att använda mycket stora intervall (t.ex. mer än faktor 10) mellan doseringarna.
20. Om allmän toxicitet observeras (t.ex. minskad kroppsvikt, verkningar på lever, hjärta eller njurar) eller andra förändringar som har observerats som kanske inte är toxiska reaktioner (t.ex. nedsatt födointag, leverförstoring), ska observerade effekter på immunförsvaret, neurologiska eller endokrint känsliga endpoints bör tolkas med försiktighet.

Toleranstest

21. Om ett test vid en dosnivå på minst 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag eller, vid tillförsel via foder eller dricksvatten, en motsvarande procentandel i fodret eller dricksvattnet (baserad på fastställd kroppsvikt) genom användning av de förfaranden som beskrivs för denna studie, inte ger några observerbara toxiska verkningar och om ingen toxicitet förväntas på grundval av data från strukturellt närbesläktade kemikalier är det inte nödvändigt att genomföra en fullständig studie med tre doseringsnivåer. Toleranstestet tillämpas, utom när mänsklig exponering anger att en högre dosnivå ska användas.

Administrering av doser

22. Djuren doseras dagligen med testkemikalier, 7 dagar per vecka under en period av 28 dagar. När testkemikalien tillförs genom sondmatning bör detta ske i en engångsdos via magsond eller lämplig intubationskanyl. Den största mängd vätska som kan administreras vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör inte överskrida 1 ml per 100 g kroppsvikt utom i de fall när vattenlösningar används, då kan 2 ml per 100 g kroppsvikt användas. Med undantag för irriterande eller frätande kemikalier, som normalt kommer att visa stegrade verkningar vid högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom justering av koncentrationen, för att säkerställa en konstant volym vid alla dosnivåer.
23. För kemikalier som tillförs via foder eller dricksvatten är det viktigt att säkerställa att kvantiteterna av den berörda testkemikalien inte påverkar normal närings- eller vattenbalans. När testkemikalien tillförs via kosten kan antingen en konstant foderkoncentration (PPM) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt användas; valet måste anges. När en kemikalie tillförs genom sondmatning bör dosen ges vid samma tidpunkt varje dag, och justeras vid behov för att upprätthålla en konstant dosnivå i förhållande till djurets kroppsvikt. Om en upprepad doseringsstudie används som inledning till en långtidsstudie ska ett liknande foder användas i båda studierna.

Observationer

24. Observationsperioden ska vara 28 dagar. Djuren i en satellitgrupp där uppföljande observationer planeras, ska hållas i minst 14 dagar utan behandling för att fördröjda eller kvarstående verkningar eller återhämtning från toxiska effekter ska kunna upptäckas.
25. Allmänna kliniska observationer bör göras minst en gång per dag, helst vid samma tidpunkt(er) med hänsyn till maximalt förväntade effekter efter doseringen. Djurens hälsotillstånd bör registreras. Minst två gånger dagligen bör djuren observeras beträffande morbiditet och mortalitet.

26. En gång före den första exponeringen (för att möjliggöra individuella jämförelser), och därefter minst en gång per vecka, ska ingående kliniska observationer göras av samtliga djur. Dessa observationer bör göras utanför buren på avsedd plats och helst vid samma tidpunkt varje gång. De bör noggrant registreras, helst med hjälp av ett poängsystem som utförligt definierats av testlaboratoriet. Ansträngningar bör göras för att säkerställa att testbetingelsernas variationer är minimala, och att observationerna utförs av någon som inte känner till behandlingen. Observationerna bör omfatta, men inte begränsas till, förändringar i hud, päls, ögon, slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (t.ex. tårflöde, upprest hårrem, pupillstorlek, ovanligt andningsmönster). Förändringar i gång, hållning och reaktion på hantering liksom eventuella kramper eller spasmer, stereotypier (t.ex. överdrivet putsande, repetitivt cirklande) eller bisart beteende (t.ex. självstymning, baklängesgång) ska också registreras (2).
27. Under fjärde exponeringsveckan bör bedömningar göras av sensoriska reaktioner på stimuli av olika slag (2) (t.ex. hörsel, syn och djupsensorisk stimuli) (3) (4) (5), bedömning av greppstyrka (6) och motorisk aktivitet (7). Ytterligare uppgifter om de procedurer som kan följas finns i respektive hänvisningar. Dock kan andra procedurer än de som hänvisats till användas.
28. Funktionella observationer som görs under fjärde exponeringsveckan kan utelämnas om studien utförs som inledning till en subkronisk studie (90-dagars). I så fall bör de funktionella observationerna tas med i denna uppföljningsstudie. Å andra sidan kan tillgången på data om funktionella observationer från studien med upprepad dosering öka möjligheten att välja dosnivåer för en efterföljande subkronisk studie.
29. I undantagsfall kan funktionella observationer utlämnas för grupper som annars skulle uppvisa tecken på toxicitet i sådan utsträckning att det väsentligen skulle påverka funktionstestets prestanda.
30. Vid obduktion kan östruscykeln för alla honor bestämmas (valfritt) genom ett vaginalt utstryksprov. Dessa observationer ger information beträffande östruscykelns stadium vid tiden för avlivandet och hjälper till med den histologiska utvärderingen av östrogenkänsliga vävnader (se vägledning om histopatologi (19)).

Kroppsvikt och foder-/vattenkonsumtion

31. Alla djur bör vägas minst en gång i veckan. Mätning av foderkonsumtion bör göras minst en gång i veckan. Om testkemikalien tillförs via dricksvattnet bör även vattenkonsumtionen mätas minst en gång i veckan.

Hematologi

32. Följande hematologiska undersökningar bör göras i slutet av testperioden: hematokrit, hemoglobin koncentration, erytrocyträkning, retikulocyter, total och differential räkning av leukocyter, trombocyter och en mätning av blodets koagulerings-/potential. Andra bestämningar som bör utföras, om testkemikalien eller dess förmodade metaboliter har eller misstänkas ha oxiderande egenskaper, inkluderar methemoglobinkoncentration och Heinz-kroppar.
33. Blodprover bör tas från ett angivet ställe strax före eller som ett led i förfarandet för avlivning av djuren, och förvaras under lämpliga förhållanden. Djuren bör fasta över natten före avlivandet (1).

Klinisk biokemi

34. Kliniska biokemiska bestämningar för att undersöka betydande toxiska effekter på vävnader, särskilt påverkan på lever och njurar, bör utföras på blodprov tagna på samtliga djur strax före, eller som ett led i, avlivningsproceduren (bortsett från de döende och/eller de som avlivats före studiens upphörande). Undersökningar av plasma eller serum ska omfatta natrium, kalium, glukos, totalkolesterol, urinämne, kreatinin, totalprotein och albumin, minst två enzymer som indikerar effekter på leverceller (såsom alaninaminotransferas, aspartataminotransferas, alkaliskt fosfat, γ -glutamyltranspeptidas och glutamatdehydrogenas), samt gallsyror. Mätningar av ytterligare enzymer (från lever eller annat ursprung) och bilirubin kan under vissa omständigheter ge användbar information.
35. Eventuellt kan också följande urinanalyser utföras under studiens sista vecka med klockad uppsamling av urinvolym: utseende, volym, osmolalitet eller specifik vikt, pH, protein, glukos och blod/blodceller.

(1) För en rad olika mätningar i serum och plasma, särskilt för glukos, är nattlig fasta att föredra. Huvudorsaken till denna preferens är att den ökade variabilitet som oundvikligen följer av utebliven fasta skulle tendera att maskera subtilare effekter och försvara tolkningen. Å andra sidan kan dock den nattliga fastan inkräkta på djurens allmänna metabolism och kan, särskilt under foderstudier, störa den dagliga exponeringen för testkemikalien. Om nattlig fasta används ska klinisk biokemisk bestämning utföras efter utförandet av funktionella observationer under vecka 4 i studien.

36. Dessutom bör man överväga studier för att undersöka plasma- eller serummarkörer för allmänna vävnadsskador. Andra bestämningar som bör utföras, om kända egenskaper hos testkemikalien kan, eller misstänks, påverka relaterade metaboliska profiler, inkluderar kalcium, fosfat, triglycerider, specifika hormoner och kolines-teraser. Dessa bör identifieras för kemikalier i vissa klasser, eller från fall till fall.
37. Även om man i den internationella utvärderingen av endokrinrelaterade endpoints inte kunde påvisa en klar fördel för bestämning av sköldkörtelhormoner (T3, T4) och TSH, kan det vara till hjälp att bevara plasma- eller serumprover för att mäta T3, T4 och TSH (valfritt), om det finns indikation på påverkan av hypofys-sköldkörtelaxeln. För att lagra proverna kan de frysas vid -20° . Följande faktorer kan påverka variationen och de absoluta koncentrationerna för hormonbestämningarna:
- Tidpunkt för avlivningen beroende på hormonkoncentrationernas dygnsvariation.
 - Avlivningsmetod för att undvika onödig stress hos djuren som kan påverka hormonkoncentrationerna.
 - Testsatser för hormonbestämningar som kan skilja sig åt genom sina standardkurvor.
- En slutgiltig identifiering av sköldkörtelaktiva kemikalier är mer tillförlitlig genom histopatologisk analys snarare än hormonnivåer.
38. Plasmaprover särskilt avsedda för hormonbestämning bör tas vid en jämförbar tid på dagen. Det rekommenderas att man bör överväga om bestämningar av T3, T4 och TSH utlöstes på grund av förändringar av sköldkörtelns histopatologi. De numeriska värden som erhöles vid analys av hormonkoncentrationer skiljer sig åt mellan de olika analysatser som finns i handeln. Därför är det kanske inte möjligt att tillhandahålla prestandakriterier baserade på enhetliga historiska data. Alternativt bör laboratorerna sträva efter att hålla variationskoefficienterna under 25 för T3 och T4, och under 35 för TSH. Alla koncentrationer ska anges i ng/ml.
39. Om historiska basdata är otillräckliga bör hänsyn tas till hematologiska och kliniska biokemiska variabler innan doseringen påbörjas eller företrädesvis för en uppsättning djur som inte ingår i försöksgrupperna.

PATOLOGI

Obduktion

40. Samtliga djur i studien bör underkastas en fullständig obduktion, som omfattar omsorgsfull granskning av kroppens yttre ytor, alla kroppsöppningar samt kranium, bröst- och bukhåla och deras innehåll. Lever, njurar, binjuror, testiklar, bitestiklar, prostata + sädesblåsar med koagulerade körtlar i sin helhet, bräss, mjälte, hjärna och hjärta från samtliga djur (med undantag av de döende och/eller de som har avlivats före studiens upphörande) ska putsas från angränsande vävnad vid behov, och deras våtvikt ska bestämmas så snart som möjligt efter dissektionen för att undvika uttorkning. Försiktighet måste iaktas vid putsning av prostatakomplexet för att undvika punktion av de vätskefyllda blåsorna. Alternativt kan sädesblåsar och prostata trimmas och vägas efter fixering.
41. Dessutom skulle två andra vävnader eventuellt kunna vägas så snart som möjligt efter dissektionen, för att undvika uttorkning: parade äggstockar (våtvikt) och livmodern, inklusive livmoderhalsen (vägledning om borttagning och beredning av livmodervävnad för viktmatning finns i OECD:s TG 440 (18)).
42. Sköldkörtelns vikt (valfritt) kan bestämmas efter fixering. Putsning ska också göras väldigt försiktigt, och först efter fixeringen för att undvika vävnadsskador. Vävnadsskador kan äventyra den histopatologiska analysen.
43. Följande vävnader bör bevaras i det mest lämpade fixeringsmedlet för både vävnadstypen och den planerade efterföljande histopatologiska undersökningen (se punkt 47): Alla större skador, hjärna (representativa områden omfattande cerebrum, cerebellum och pons), ryggmärg, ögon, mage, tunn- och tjocktarm (inklusive Peyers plack), lever, njurar, binjuror, mjälte, hjärta, bräss, sköldkörtel, luftstrupe och lungor (konserverade genom uppumpning med fixeringsmedel och därefter nedsänkning), könskörtlar (testiklar och äggstockar), accessoriska könsorgan (uterus och cervix, epididymen, prostata + sädesblåsar med koaguleringskörtlar), vagina, urinblåsa, lymfkörtlar (vid sidan av den mest proximala dräneringsnoden bör en annan lymfnod tas i enlighet med laboratoriets erfarenheter (15)), perifer nerv (ischias eller tibia) helst nära muskeln, skelettmuskel och ben med benmärg (sektion eller, alternativt, ett nymonterat benmärgsaspirat). Det rekommenderas att testiklarna fixeras genom nedsänkning i Bouins fixativ eller modifierat Davidsons fixativ (16) (17). Tunica albuginea måste försiktigt och ytligt punkteras med en nål på organets båda poler för en snabb inträngning av fixativet. Kliniska och andra fynd kan indikera behovet av att undersöka ytterligare vävnader. Också alla organ som sannolikt är målorgan, baserat på kunskap om testkemikalien egenskaper, ska konserveras.

44. Följande vävnader kan ge värdefulla tecken på endokrinrelaterade effekter: Könskörtlar (äggstockar och testiklar), accessoriska könsorgan (uterus inklusive cervix, epididymis, sädesblåsor med koaguleringskörtlar, dorsolaterala och ventrala prostata), vagina, hypofys, manliga bröstkörtlar, sköldkörtel och binjuror. Förändringar i manliga bröstkörtlar är inte tillräckligt väl dokumenterade, men denna parameter kan vara väldigt känslig för ämnen med östrogen verkan. Observation av organ/vävnader som inte nämns i avsnitt 43 är valfria (se tillägg 2).
45. Vägledning om histopatologi (19) omfattar detaljerad information om dissektion, fixering, sektionering och histopatologi av endokrina vävnader.
46. I det internationella testprogrammet erhöles vissa belägg för att subtila endokrina verkningar av kemikalier med en låg potens för att påverka könshormonhomeostas, kan identifieras genom störning av östruscykelns synkronisering i olika vävnader, och inte så mycket genom franka histopatologiska förändringar i kvinnliga könsorgan. Även om inga direkta bevis erhöles för sådana effekter, rekommenderas att bevis för eventuell asynkroni i östruscykeln ska tas med i beräkningen vid tolkningen av äggstockarnas histopatologi (follikulära, thecala och granulosa celler), uterus, cervix och vagina. Om utvärderat kan det skede av cykeln som bestämts genom vaginala utstryk också ingå i denna jämförelse.

Histopatologi

47. En fullständig histopatologisk undersökning bör utföras på bevarade organ och vävnader från samtliga djur i kontroll- och högdosgrupperna. Dessa undersökningar bör utsträckas till djur i alla andra doseringsgrupper, om behandlingsrelaterade förändringar observeras i högdosgruppen.
48. Alla större skador ska undersökas.
49. Om en satellitgrupp används bör en histopatologisk undersökning utföras på de vävnader och organ på vilka effekter har visats i de behandlade grupperna.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

50. Individuella data ska lämnas. Därutöver bör alla data sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antal djur vid testets början, antal djur som påfanns döda under testet eller som avlivats av humanitära skäl och tidpunkten för dödsfallen eller eutanasin, antal djur som visar tecken på toxicitet, en beskrivning av de tecken på toxicitet som observerats, inklusive tidpunkt för de första tecknen, varaktighet och hur allvarliga de toxiska verkningarna är, antal djur som uppvisar skador, typ av skador, deras svårighetsgrad och procentandelen djur som uppvisar varje typ av skada.
51. Om möjligt bör numeriska resultat utvärderas genom en lämplig och allmänt vedertagen statistisk metod. Vid jämförelser av effekten längs ett dosintervall bör man undvika användningen av multipla t-tester. Statistiska metoder ska väljas vid utformningen av studien.
52. Som kvalitetskontroll föreslås att historiska kontrolldata samlas in för numeriska data, och med dem beräknas variationskoefficienter, särskilt för de parametrar som kopplas till endokrinstörande upptäckt. Dessa data kan sedan användas för jämförelseändamål när aktuella studier utvärderas.

Testrapport

53. Testrapporten måste innehålla följande information:

Testkemikalie:

- Fysikalisk natur, renhet och fysikalisk-kemiska egenskaper.
- Identifikationsuppgifter.

Vehikel (i förekommande fall):

- Motivering för val av vehikel, om annan än vatten.

Försöksdjur:

- Art och stam som används.
- Djurens antal, ålder och kön.
- Ursprung, inhysning, kost etc.
- Djurens individuella vikt vid testets början.
- Motivering för val av art, om inte rätta.

Försöksbetingelser:

- Grund för valet av dosnivå.
- Uppgifter om testkemikalien sammansättning/foderberedning, uppnådd koncentration, preparatets stabilitet och homogenitet.
- Uppgifter om administreringen av testkemikalien.
- Omvandling från fodrets/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (ppm) till faktisk dos (mg/kg kroppsvikt/dag), i förekommande fall.
- Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

Valfria endpoints som undersöktes

- Lista över valfria endpoints som undersöktes.

Resultat:

- Kroppsvikt/kroppsviktsförändringar.
- Foderkonsumtion och vattenkonsumtion, i förekommande fall.
- Uppgifter om toxiska reaktioner efter kön och dosnivå, inklusive tecken på toxicitet.
- Art, allvarlighetsgrad och varaktighet för kliniska observationer (huruvida de är reversibla eller ej).
- Bedömning av sensorisk aktivitet, greppstyrka och motorisk aktivitet.
- Blodundersökningar med relevanta basvärden.
- Kliniska biokemiska undersökningar med relevanta basvärden.
- Uppgifter om kroppsvikt vid avlivning och organvikt.
- Obduktionsfynd.
- En detaljerad beskrivning av samtliga histopatologiska fynd.
- Absorptionsdata, i förekommande fall.
- Statistisk bearbetning av resultaten, i tillämpliga fall.

*Diskussion av resultaten.**Slutsatser.*

Tillägg 1

DEFINITIONER

Androgenicitet är förmågan hos en kemikalie att agera som ett naturligt androgent hormon (t.ex. testosteron) i en däggdjursorganism.

Antiandrogenicitet är förmågan hos en kemikalie att undertrycka verkan av ett naturligt androgent hormon (t.ex. testosteron) i en däggdjursorganism.

Anti-östrogenicitet är förmågan hos en kemikalie att undertrycka verkan av ett naturligt östrogent hormon (t.ex. 17 β -östradiol) i en däggdjursorganism.

Antityreoid aktivitet är förmågan hos en kemikalie att undertrycka verkan av ett naturligt sköldkörtelhormon (t.ex. T₃) i en däggdjursorganism.

Dosering är en allmän term som omfattar dos, dess frekvens och doseringens varaktighet.

Dos är den mängd testkemikalie som administreras. Dosen uttrycks som testkemikalies vikt per enhet kroppsvikt av försöksdjur per dag (t.ex. mg/kg kroppsvikt/dag), eller som en konstant kostkoncentration.

Uppenbar toxicitet är en allmän term som beskriver tydliga tecken på toxicitet efter tillförsel av testkemikalien. Dessa bör vara tillräckliga för en riskbedömning och bör vara sådana att en ökning av den tillförda dosen kan förväntas resultera i utvecklingen av allvarliga toxicitetssymptom och sannolikt leda till mortalitet.

NOAEL är förkortningen för nivån där ingen skadlig effekt observeras. Detta är den högsta dosnivå där inga behandlingsrelaterade fynd observerats på grund av behandling.

Östrogenicitet är förmågan hos en kemikalie att agera som ett naturligt östrogent hormon (t.ex. 17 β -östradiol) i en däggdjursorganism.

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

Tyreoid aktivitet är förmågan hos en kemikalie att agera som ett naturligt sköldkörtelhormon (t.ex. T₃) i en däggdjursorganism.

Validering är en vetenskaplig process utformad för att karakterisera de operativa kraven och begränsningarna hos en testmetod och visa dess tillförlitlighet och relevans för ett visst ändamål.

Tillägg 2

Endpoints rekommenderade för upptäckt av endokrinostörande ämnen (EDS) i denna B.7-testmetod

Obligatoriska endpoints	Valfria endpoints
Vikt	
<ul style="list-style-type: none"> — Testiklar — Epididymis — Binjurar — Prostata + sädesblåsor med koagulerande körtlar 	<ul style="list-style-type: none"> — Äggstockar — Uterus, inklusive cervix — Sköldkörtel
Histopatologi	
<ul style="list-style-type: none"> — Könskörtlar: <ul style="list-style-type: none"> — Testiklar och — Äggstockar — Accessoriska könsorgan: <ul style="list-style-type: none"> — Epididymis, — Prostata + sädesblåsa med koagulerande körtlar — Uterus, inklusive cervix — Binjure — Sköldkörtel — Vagina 	<ul style="list-style-type: none"> — Vaginala utstryk — Manliga bröstkörtlar — Hypofys
Hormonmätningar	
	<ul style="list-style-type: none"> — Cirkulerande T3- och T4-nivåer — Cirkulerande TSH-nivåer

LITTERATUR

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

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

B.8 SUBAKUT INHALATIONSTOXICITET: 28-DAGARS STUDIE

SAMMANFATTNING

Denna reviderade B.8-testmetod har utformats för att fullständigt karakterisera testkemikaliers inhalationstoxicitet vid upprepade exponeringar under en begränsad tidsperiod (28 dagar), och för att tillhandahålla data för kvantitativa riskbedömningar. Grupper om minst 5 hangnagare och 5 hongnagare exponeras 6 timmar per dag under 28 dagar för a) testkemikalien vid tre eller fler koncentrationsnivåer, b) filtrerad luft (negativ kontroll, och/eller c) vehikeln (vehikelkontroll). Djur exponeras i allmänhet 5 dagar per vecka, men exponering 7 dagar per vecka är också tillåten. Hanar och honor testas alltid, men de kan exponeras vid olika koncentrationsnivåer om det är känt att ett kön är mer mottagligt för en viss testkemikalie. Denna metod ger försöksledaren flexibilitet att inkludera satellitgrupper (reversibilitet), lungsköljning (BAL), neurologiska tester och ytterligare klinisk patologi och histopatologiska utvärderingar för att bättre kunna karakterisera en testkemikaliers toxicitet.

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje 412 (2009). Den ursprungliga testriktlinjen 412 (TG 412) för subakut inhalation antogs 1981 (1). Den här testmetoden B.8 (som motsvarar den reviderade testriktlinjen 412) har uppdaterats för att återspegla vetenskapen och möta nuvarande och framtida lagstiftningsbehov.
2. Den här testmetoden medger karakterisering av negativa effekter efter upprepad daglig exponering genom inhalation av en testkemikalie under 28 dagar. Uppgifterna som kommer från en 28-dagars substudie av akut inhalationstoxicitet kan användas för kvantitativa riskbedömningar (om den inte följs av en 90-dagars studie av subkronisk inhalationstoxicitet (kapitel B.29 i denna bilaga)). Uppgifterna kan också ge information om valet av koncentrationer för långtidsstudier såsom 90-dagarsstudien av subkronisk inhalationstoxicitet. Den här testmetoden är inte specifikt avsedd för testning av nanomaterial. Definitioner som används inom ramen för den här metoden finns i slutet av det här kapitlet och i vägledningsdokumentet 39 (2).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

- All tillgänglig information om testkemikalien bör beaktas av laboratoriet innan studien genomförs i syfte att höja studiens kvalitet och minimera djuranvändningen. Information som underlättar valet av lämpliga testkoncentrationer kan inkludera identitet, kemisk struktur, och fysikalisk-kemiska egenskaper hos testkemikalien, resultat från eventuella in vitro- eller in vivo-toxicitetstester, förväntad användning(ar) och risken för mänsklig exponering, tillgängliga (Q)SAR-data och toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier och data från testning av akut inhalationstoxicitet. Om neurotoxicitet förväntas eller observeras under studiens gång, kan försöksledaren välja att inkludera lämpliga utvärderingar såsom en funktionell samlingsstudie (FOB) och mätning av motorisk aktivitet. Även om tidpunkter för exponeringar i förhållande till specifika undersökningar kan vara kritiska, bör resultaten från dessa extra aktiviteter inte störa studiens grundläggande utformning.
- Utspädning av korrosiva eller irriterande testkemikalier kan testas vid koncentrationer som kommer att ge den önskade graden av toxicitet (se GD 39 (2)). När djur utsätts för dessa material bör mällkoncentrationerna vara tillräckligt låga för att inte orsaka avsevärd smärta och lidande, men ändå tillräckliga för att utsträcka koncentration-respons-kurvan till nivåer som gör att testets regulatoriska och vetenskapliga mål kan uppnås. Dessa koncentrationer bör väljas från fall till fall, företrädesvis baserade på en adekvat utformad undersökning av spännvidden som ger information om den kritiska endpointen, eventuellt tröskelvärde för irritation och tiden för de första tecknen (se punkterna 11–13). Motivering för valet av koncentration ska anges.
- Döende djur eller djur som visar tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande ska avlivas skonsamt. Döende djur betraktas på samma sätt som de som dör under testet. Kriterier för att ta beslutet att avliva döende eller svårt lidande djur, och vägledning om hur man känner igen tecken på förutsägbar eller annalkande död, omfattas i OECD:s vägledningsdokument om humana endpoints (3).

METODBESKRIVNING

Val av djurart

- I testet bör friska unga vuxna gnagare användas av stammar som vanligtvis används på laboratorier. För detta test används råttor. Motivering ska ges om annan art används.

Förberedelse av djuren

- Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga. På dagen för randomiseringen bör djuren vara unga vuxna 7 till 9 veckor gamla. Kroppsvikten bör ligga inom $\pm 20\%$ av medelvikten för vardera könet. Djuren väljs ut slumpvis och märks för individuell identifikation, och får därefter akklimatisera sig till laboratoriets betingelser i sina burar i minst fem dagar före teststarten.

Djurhållning

- Djuren bör identifieras individuellt, om möjligt med subkutana transpondrar för att underlätta observationer och undvika förvirring. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 ± 3 °C. Den relativa fuktigheten bör ligga mellan 30 och 70 %, även om detta kanske inte är möjligt när vatten används som vehikel. Före och efter exponeringen bör djuren inhysas i grupper avhängigt kön och koncentration, dock får antalet djur per bur inte hindra en tydlig observation av varje enskilt djur, och förluster genom kannibalism och slagsmål bör minimeras. Om endast djurens nos ska exponeras kan det vara nödvändigt att de får akklimatisera sig till fasthållningsrören. Fasthållningsrören ska inte medföra onödigt fysisk, termisk eller fasthållningsstress för djuren. Fasthållning kan påverka fysiologiska endpoints såsom kroppstemperatur (hypotermi) och/eller minimala respiratoriska volymer. Om det finns generiska data tillgängliga som inte pekar på sådana förändringar i någon nämnvärd omfattning är det inte nödvändigt med anpassningen till rören före exponeringen. Djur vars hela kroppar ska exponeras för en aerosol ska inhysas individuellt under exponeringen för att förhindra att de andra djuren i buren filtrerar aerosolen genom sina pälsar. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, utom under exponeringen, tillsammans med en obegränsad tillgång till vatten. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker.

Inhalationskammare

- Vid val av inhalationskammare bör man beakta kemikalien beskaffenhet och ändamålet med testet. Det föredragna exponeringssättet är enbart nos (termen inkluderar även enbart huvud, enbart nos eller enbart tryne). Exponering av enbart nos föredras i allmänhet vid studier av vätskor och fasta aerosoler och ånga som kan kondenseras och bilda aerosoler. Vissa av undersökningens mål kan bättre uppnås genom exponering av hela kroppen, men detta ska motiveras i undersökningsrapporten. För att säkerställa atmosfärisk stabilitet vid användningen av en helkroppskammare ska den totala "volymen" försöksdjur inte överskrida 5 % av kammarens volym. Teknikerna för enbart nos och helkroppsexponeringens deras principer och särskilda för- och nackdelar behandlas i GD 39 (2).

TOXICITETSSTUDIER

Koncentrationsgränser

10. Till skillnad från akuta studier finns det inga fastställda koncentrationsgränser i 28-dagarsstudier av subakut inhalationstoxicitet. För den högsta testade koncentrationen bör man beakta: 1) högsta möjliga koncentration, 2) värsta tänkbara fall av mänsklig exponering, 3) behovet av att ge en tillräcklig syretillförsel och/eller 4) djurskyddsskäl. I avsaknad av databaserade gränsvärden får de akuta gränsvärdena i förordning (EG) nr 1272/2008 (13) användas (dvs. upp till en högsta koncentration av 5 mg/l för aerosoler, 20 mg/l för ångor och 20 000 ppm för gaser), se GD 39 (2). Motivering ska ges om det är nödvändigt att överskrida dessa gränsvärden vid testning av gaser eller mycket flyktiga testkemikalier (t.ex. köldmedier). Koncentrationsgränser bör framkalla tydlig toxicitet utan att utsätta djuren för onödig stress eller påverka deras livslängd (3).

Spännviddsstudie

11. Innan huvudstudien påbörjas kan det vara nödvändigt att genomföra en spännviddsstudie. En spännviddsstudie är mer omfattande än en inledande studie eftersom den inte är begränsad till valet av koncentration. Kunskap från en spännviddsstudie kan leda till en lyckad huvudstudie. En spännviddsstudie kan till exempel ge teknisk information om analysmetoder, partikeldimensionering, upptäckt av toxiska mekanismer, klinisk patologi- och histopatologidata, och en uppskattning av vad som kan vara NOAEL- och MTC-koncentrationer i en huvudstudie. Försöksledaren kan välja att använda en spännviddsstudie för att identifiera tröskelvärdet för irritation i luftvägarna (t.ex. med histopatologi i luftvägarna, lungfunktionstest eller lungsköljning), den övre koncentration som tolereras utan att djuren utsätts för onödig stress och parametrarna som bäst kännetecknar en testkemikalies toxicitet.
12. En spännviddsstudie kan bestå av en eller flera koncentrationsnivåer. Inte fler än tre hanar och tre honor ska exponeras vid varje koncentrationsnivå. En spännviddsstudie ska pågå under minst 5 dagar och vanligtvis inte mer än i 14 dagar. Motiveringen för valet av koncentrationer till huvudstudien ska ges i undersökningsrapporten. Syftet med huvudstudien är att påvisa ett koncentration-respons-förhållande baserat på vad som förväntas vara den mest känsliga endpointen. Den låga koncentrationen bör helst vara en koncentration utan en påvisbar skadlig effekt medan den höga koncentrationen bör framkalla tydlig toxicitet utan att utsätta djuren för onödig stress eller påverka deras livslängd (3).
13. Vid valet av koncentrationsnivåer för spännviddsstudien bör all tillgänglig information beaktas, inklusive struktur-aktivitetsförhållanden samt data för liknande kemikalier (se punkt 3). En spännviddsstudie kan verifiera/motbevisa vad som anses vara de endpoints som är mest mekanistiskt baserade, t.ex. kolinesterasinhibition av organiska fosforföreningar, methemoglobinbildning av erytrocytotoxiska agens, sköldkörtelhormoner (T₃, T₄) för tyreotoxiska ämnen, protein, LDH eller neutrofiler i bronkialsköljning för ofarliga svårlösliga partiklar eller lungretande aerosoler.

Huvudstudie

14. Huvudstudien för subakut toxicitet består i allmänhet av tre koncentrationsnivåer och även samtidiga negativa (luft) och/eller vehikelkontroller efter behov (se punkt 17). Alla tillgängliga data bör användas för att underlätta valet av lämpliga exponeringsnivåer, inklusive resultaten från de systematiska toxicitetsstudierna, metabolism och kinetik (särskild vikt bör läggas vid att undvika höga koncentrationsnivåer som mättar kinetiska processer). Varje testgrupp består av minst 10 gnagare (5 hanar och 5 honor) som exponeras för testkemikalien 6 timmar per dag 5 dagar per vecka under en period på 4 veckor (total studielängd 28 dagar). Djuren kan också exponeras 7 dagar per vecka (t.ex. vid testning av läkemedel som inhaleras. Om ett kön är känt för att vara mer mottagligt för en viss testkemikalie kan könen exponeras vid olika koncentrationsnivåer för att optimera koncentrationsresponsen enligt beskrivningen i punkt 15. Om andra gnagare än råttor exponeras enbart nos, får maximala exponeringstider justeras för att minska artspecifikt lidande. En motivering bör ges när man använder en kortare exponeringstid än 6 timmar/dag, eller när det är nödvändigt att utföra en helkroppsexponeringsstudie med lång varaktighet (t.ex. 22 timmar/dag) (se GD 39 (2)). Inget foder ska ges under exponeringsperioden, om den inte överskrider 6 timmar. Vatten kan tillhandahållas under en helkroppsexponering.
15. Den målkoncentration som valts ska identifiera målorgan(en) och påvisa en tydlig koncentrationsrespons:
 - Den höga koncentrationsnivån bör leda till toxiska effekter, men inte orsaka kvardröjande tecken eller dödlighet, vilket kan förhindra en meningsfull utvärdering.
 - Den mellanliggande koncentrationsnivån(erna) bör spridas ut för gradering av toxiska effekter mellan den låga och höga koncentrationen.
 - Den låga koncentrationsnivån bör frambringe få eller inga belägg för toxicitet.

Satellitstudie (reversibilitet)

16. En satellitstudie (reversibilitet) kan användas för att observera reversibilitet, persistens eller fördröjd toxicitet för en efterbehandlingsperiod av lämplig längd, dock inte mindre än 14 dagar. Satellitgrupper (reversibilitet) består av fem hanar och fem honor som exponeras samtidigt med försöksdjuren i huvudstudien. Satellitstudiegrupper bör exponeras för testkemikalien vid den högsta koncentrationsnivån och det bör finnas samtidiga luft- och/eller vehikelkontroller efter behov (se punkt 17).

Kontrolldjur

17. Samtidiga negativa (luft-) kontrolldjur bör hanteras på ett sätt som är identiskt med djuren i testgruppen, förutom att de exponeras för filtrerad luft i stället för testkemikalien. När vatten eller annat ämne används för att generera testatmosfären bör en vehikelkontrollgrupp i stället för en negativ (luft-) kontrollgrupp ingå i studien. Vatten bör användas som vehikel närhelst det är möjligt. När vatten används som vehikel bör kontrolldjuren exponeras för luft med samma relativa fuktighet som de exponerade grupperna. Valet av en lämplig vehikel bör grunda sig på en lämpligt utförd förstudie eller historiska data. Om en vehikels toxicitet inte är känd kan försöksledaren välja att använda både en negativ (luft-) kontroll och en vehikelkontroll, men det rekommenderas inte. Om historiska data visar att en vehikel inte är toxisk finns det inget behov av en negativ (luft-) kontrollgrupp och då bör endast en vehikelkontroll användas. Om en förstudie av en testkemikalie som beretts i en vehikel inte visar någon toxicitet, framgår det att vehikeln inte är toxisk vid den testade koncentrationen och att denna vehikelkontroll bör användas.

EXPONERINGSBETINGELSER**Administration av koncentrationer**

18. Djur exponeras för testkemikalien som en gas, ånga, aerosol eller en blandning av dem. Det fysikaliska tillstånd som ska testas beror på testkemikalins fysikalisk-kemiska egenskaper, vald koncentration och/eller dess mest sannolika fysikaliska form vid hanteringen och användningen. Hygroskopiska och kemiskt reaktiva testkemikalier ska testas i torr luft. Det är viktigt att se till att inga explosiva koncentrationer skapas. För att minska partikelstorleken kan partikelmaterialet utsättas för mekaniska processer. Mer vägledning finns i GD 39 (2).

Partikelstorleksfördelning

19. Partikeldimensionering bör utföras för alla aerosoler och ångor som kan kondenseras och bilda aerosoler. För att möjliggöra exponering av alla relevanta områden i luftvägarna, rekommenderas aerosoler med en aerodynamisk diameter (MMAD) i intervallet 1 till 3 µm med en geometrisk standardavvikelse (σ_g) i intervallet 1,5 till 3,0 (4). Även om en rimlig ansträngning krävs för att uppfylla denna standard, bör en sakkunnig bedömning ges om detta inte kan uppnås. Till exempel kan rökpartiklar av metall vara mindre än denna standard, och laddade partiklar och fibrer kan överstiga den.

Beredning av testkemikalie i en vehikel

20. Testkemikalien ska helst testas utan en vehikel. Om det är nödvändigt att använda en vehikel för att generera en lämplig koncentration och partikelstorlek av testkemikalien, bör vatten ges företräde. Närhelst en testkemikalie är upplöst i en vehikel ska dess stabilitet påvisas.

ÖVERVAKNING AV EXPONERINGSFÖRHÅLLANDEN**Kammarens luftflöde**

21. Luftflödet genom exponeringskammaren ska omsorgsfullt kontrolleras, kontinuerligt övervakas och registreras minst en gång i timmen under varje exponering. Övervakningen i realtid av testatmosfärens koncentration (eller temporal stabilitet) är en integrerad mätning av samtliga dynamiska parametrar och ger ett indirekt sätt att kontrollera alla relevanta dynamiska inhalationsparametrar. Om koncentrationen övervakas i realtid kan mätfrekvensen för luftflöden minskas till en enda mätning per exponeringsdag. Särskild hänsyn bör tas för att undvika återandning i enbart nos-kammare. Syrehalten bör vara minst 19 % och koncentrationen av koldioxid bör inte överstiga 1 %. Om det finns anledning att tro att denna standard inte kan uppfyllas bör man mäta koncentrationen av syre och koldioxid. Om mätningar under den första exponeringsdagen visar att dessa gaser har korrekta nivåer behöver inga fler mätningar utföras.

Kammarens temperatur och relativa fuktighet

22. Kammarens temperatur bör upprätthållas vid 22 ± 3 °C. Relativ fuktighet i djurens andningszoner, för både enbart nos och helkroppsexponering, bör om möjligt övervakas kontinuerligt och registreras varje timme för varje exponering. Den relativa fuktigheten bör helst upprätthållas inom intervallet 30 till 70 %, men detta kanske inte är möjligt (t.ex. vid testning av vattenbaserade blandningar), eller inte mätbart på grund av att testkemikalien stör själva testmetoden.

Testkemikalie: nominell koncentration

23. När det är möjligt bör den nominella koncentrationen i exponeringskammaren beräknas och registreras. Den nominella koncentrationen är massan av den genererade testkemikalien dividerad med den totala volymen av luft som passerade genom inhalationskammarsystemet. Den nominella koncentrationen används inte för att karakterisera djurens exponering, men en jämförelse mellan den nominella koncentrationen och den faktiska koncentrationen ger en indikation på testsystemets genereringsprestanda, och kan därmed användas för att upptäcka genereringsproblem.

Testkemikalie: faktisk koncentration

24. Den faktiska koncentrationen är testkemikaliekoncentrationen som samlats in i djurets andningsområde i en inhalationskammare. Faktiska koncentrationer kan erhållas antingen genom särskilda metoder (t.ex. direkt provtagning, adsorptiva eller kemiskt reaktiva metoder, och efterföljande analytisk karakterisering) eller genom icke-specifika metoder såsom gravimetrisk filteranalys. Användningen av gravimetrisk analys är endast acceptabel för pulveraerosoler bestående av en enda komponent eller aerosoler bestående av vätskor med låg flyktighet, och bör stödjas av en lämplig preklinisk studie med kemikaliespecifik karakterisering. Koncentrationen i pulveraerosoler bestående av flera komponenter kan också bestämmas genom gravimetrisk analys. Detta kräver dock analysresultat som visar att sammansättningen av luftburet material liknar startmaterialet. Om denna information inte finns tillgänglig kan det vara nödvändigt med en ny analys av testkemikalien (helst i sitt luftburna tillstånd) under loppet av studien. För medel i aerosolform som kan förångas eller sublimeras bör man kunna visa att samtliga faser uppsamlades med den valda metoden.
25. En sats av testkemikalien ska användas genom hela studien, om möjligt, och provet ska lagras under sådana förhållanden att det bibehåller sin renhet, homogenitet och stabilitet. Inför starten av studien bör det finnas en beskrivning av testkemikalien som inbegriper dess renhet och, om det är tekniskt genomförbart, identitet, och kvantiteterna av identifierade föroreningar och orenheter. Detta kan visas genom, men är inte begränsat till, följande data: retentionstid och relativ topparea, molekylvikt från masspektroskopi eller gaskromatografianalys, eller andra uppskattningar. Även om testlaboratoriet inte ansvarar för provets identitet kan det vara klokt att man i stora drag bekräftar karakteriseringen (t.ex. färg, fysisk natur etc.).
26. Exponeringsatmosfären ska hållas så konstant som möjligt. En enhet för realtidsövervakning, såsom en aerosolfotometer för aerosoler eller en analysator för totalolväte för ångor kan användas för att påvisa stabilitet hos exponeringsförhållandena. Faktisk kammarkoncentration bör mätas minst 3 gånger varje exponeringsdag vid varje exponeringsnivå. Om det inte är möjligt på grund av begränsade luftflöden eller låga koncentrationer, är det acceptabelt med ett prov per exponeringsperiod. Helst ska detta prov sedan samlas in under hela exponeringsperioden. Provtagning av kammarkoncentrationer från individuella kammare bör inte avvika från den genomsnittliga koncentrationen med mer än $\pm 10\%$ för gaser och ångor, och inte med mer än $\pm 20\%$ för flytande eller fasta aerosoler. Tid för att uppnå kammarjämvikt (t_{95}) bör beräknas och rapporteras. Varaktigheten för en exponering sträcker sig över den tid som testkemikalien genereras. Detta tar hänsyn till den tid som krävs för att uppnå kammarens jämvikt (t_{95}) och sönderfall. Riktlinjer för att uppskatta t_{95} finns i GD 39 (2).
27. För mycket komplexa blandningar bestående av gaser/ångor och aerosoler (t.ex. förbränningsatmosfärer och testkemikalier framdrivna från därför avsedd slutanvändningsprodukt-/utrustning) kan varje fas bete sig olika i en inhalationskammare. Därför ska minst ett indikatorämne väljas (analyt), vanligtvis det huvudsakliga aktiva ämnet i blandningen för varje fas (gas/ånga och aerosol). När testkemikalien är en blandning ska den analytiska koncentrationen i totalblandningen rapporteras, inte bara den aktiva ingrediensen eller indikatorämnet (analyt). Ytterligare information om faktisk koncentration finns i GD 39 (2).

Testkemikalie: partikelstorleksfördelning

28. Aerosolers partikelstorleksfördelning bör fastställas minst en gång i veckan för varje koncentrationsnivå med hjälp av en kaskadimpaktor eller ett alternativt instrument såsom en aerodynamisk partikelsorterare (APS). Om man kan visa ett likvärdigt resultat från en kaskadimpaktor och det alternativa instrumentet, kan man använda det sistnämnda under hela studien.
29. En andra enhet, till exempel ett gravimetriskt filter eller en impinger/gasbubblare, bör användas parallellt med det primära instrumentet för att bekräfta uppsamlingsprestandan hos det primära instrumentet. Masskoncentrationen som erhållits genom analys av partikelstorleken ska ligga inom rimliga gränser för den masskoncentration som erhållits genom filteranalys (se GD 39 (2)). Om likvärdigheten kan påvisas för alla koncentrationer som testats i ett tidigt skede av försöket, kan ytterligare bekräftande mätningar utelämnas. Av hänsyn till djurskyddsskäl bör åtgärder vidtas för att minimera ofullständiga uppgifter som kan leda till att studien måste upprepas.
30. Partikeldimensionering bör utföras för ångor om det finns en möjlighet att kondensen kan bilda en aerosol, eller om partiklar upptäcks i ångatmosfären som kan göra så att faserna blandas.

IAKTTAGELSER

31. Djuren bör observeras kliniskt före, under och efter exponeringsperioden. Mer frekventa iakttagelser kan indikeras beroende på djurens respons under exponeringen. När iakttagelser av djuren hindras genom användning av fasthållningsrör, dåligt upplysta kroppskammare eller ogenomskinlig atmosfär, bör djuren noga observeras efter exponeringen. Observationer före nästa dags exponering kan utvärdera eventuell reversibilitet eller stegrande toxiska effekter.
32. Alla observationer registreras med individuell registrering för varje djur. När djur avlivas av humanitära skäl eller påträffas döda, ska tidpunkten för dödsfallet registreras så noggrant som möjligt.
33. Observationer vid buren bör omfatta förändringar i hud och päls, ögon och slemhinnor, förändringar i andnings- och cirkulationssystemen, förändringar i nervsystemet, samt förändringar i kroppsmotorik och beteendemönster. Uppmärksamhet bör fästas vid iakttagelser av tremor, konvulsioner, salivutsöndring, diarré, letargi, sömn och koma. Mätningen av rektala temperaturer kan ge belägg för bradypnéreflex eller hypo/hypertermi relaterat till behandling eller inspärning. Ytterligare utvärderingar kan inkluderas i studiens protokoll såsom kinetik, biologisk övervakning, lungfunktion, retention av svårslösliga ämnen som ackumuleras i lungvävnad, samt beteendeförändringar.

KROPPSVIKT

34. De enskilda djurens vikt bör registreras strax före den första exponeringen (dag 0), därefter två gånger i veckan (till exempel på fredagar och måndagar för att påvisa återhämtning över ett exponeringsfritt veckoslut eller under ett tidsintervall för bedömning av systematisk toxicitet), och vid tidpunkten för dödsfallet eller avlivningen. Visas inga effekter under de två första veckorna kan kroppsvikterna mätas en gång i veckan för återstoden av studien. Satellitdjur (reversibilitet) (om det används) ska fortsätta vägas varje vecka under hela återhämtningsperioden. Vid studiens upphörande bör samtliga djur vägas strax före avlivningen för en objektiv beräkning av förhållandet organ-kroppsvikt.

FÖDO- OCH VATTENINTAG

35. Födointaget bör mätas varje vecka. Vattenintaget bör också mätas.

KLINISK PATOLOGI

36. Kliniska patologiska bedömningar bör göras av samtliga djur, inklusive kontroll- och satellitdjur (reversibilitet) när de avlivas. Tidsintervallet mellan exponeringens upphörande och insamlingen av blod ska registreras, i synnerhet när rekonstitueringen av endpointen är snabb. Provtagning efter att exponeringen har upphört indikeras för dessa parametrar med ett kort plasmaprov halvtid (t.ex. COHb, CHE och MetHb).
37. Tabell 1 listar de kliniska patologiska parametrar som i allmänhet krävs för alla toxikologiska studier. Urinalys krävs inte rutinmässigt, men kan utföras när det bedöms lämpligt utifrån förväntad eller observerad toxicitet. Försöksledaren kan välja att bedöma ytterligare parametrar för att bättre kunna karakterisera en testkemikalies toxicitet (t.ex. kolinesteras, lipider, hormoner, syra/bas-balans, methemoglobin eller Heinz-kroppar, kreatinkinas, myeloid/erytroid-förhållande, troponiner, arteriella blodgaser, laktatdehydrogenas, sorbitoldehydrogenas, glutamatdehydrogenas och gamma-glutamyltranspeptidas).

Tabell 1

Standardiserade parametrar för klinisk patologi

Hematologi	
Erytrocytantal	Totalt antal leukocyter
Hematokrit	Differentalt leukocytantal
Hemoglobinkoncentration	Trombocytantal
Medelvärde för korpuskulärt hemoglobin	Koaguleringsförmåga (välj ett alternativ):
Medelvärde för korpuskulär volym	— Protrobintid
Medelvärde för korpuskulär hemoglobinkoncentration	— Koagulationstid
Retikulocyter	— Partiell tromboplastintid

Klinisk kemi	
Glukos (*)	Alaninaminotransferas
Totalkolesterol	Aspartataminotransferas
Triglycerider	Alkaliskt fosfatas
Blodureakväve	Kalium
Total bilirubin	Natrium
Kreatinin	Kalcium
Totalprotein	Fosfor
Albumin	Klorid
Globulin	
Urinalys (valfritt)	
Utseende (färg och grumlighet)	Totalprotein
Volym	Glukos
Specifik vikt eller osmolalitet	Blod/blodceller
pH	

(*) Eftersom en lång fasteperiod kan införa partiskhet i glukosmätningar för de behandlade djuren jämfört med kontroldjuren, bör försöksledaren avgöra om det är lämpligt att djuren fastar. Om man använder en fasteperiod bör den vara avpassad för den art som används, för råttan kan det vara 16 timmar (fastande över natten). Bestämning av fasteglukos kan utföras efter en natts fasta under den sista exponeringsveckan, eller efter en natts fasta innan obduktionen (i det senare fallet tillsammans med alla andra kliniska patologiska parametrar).

38. När det finns bevis på att de nedre luftvägarna (dvs. alveolerna) är den främsta platsen för deponering och lagring, då kan lungsköljning vara det tekniska valet för att kvantitativt analysera hypotesbaserade doseffektparametrar med fokus på alveolit, lunginflammation och fosfolipidos. Detta gör att dosrespons och tidsförlopps-förändringar för alveolär skada grundligt kan undersökas. BAL-vätskan kan analyseras för totalt och differentiellt leukocytantal, totalprotein och laktatdehydrogenas. Andra parametrar som kan beaktas är de som tyder på lysosomal skada, fosfolipidos, fibros, och irriterande eller allergisk inflammation som kan innefatta bestämning av pro-inflammatoriska cytokiner/kemokiner. BAL-mätningar kompletterar i allmänhet resultaten från histopatologiska undersökningar, men kan dock inte ersätta dem. Vägledning om hur man utför lungsköljning finns i GD 39 (2).

MAKROSKOPISK PATOLOGI OCH ORGANVIKTER

39. Samtliga försöksdjur, inklusive de som avlider under testet eller avlivas och tas bort från undersökningen av djurskyddsskäl, bör underkastas fullständig blodtömning (om möjligt) och obduceras. Tidsperioden mellan slutfasen av varje djurs exponering och avlivandet av dem ska registreras. Om en obduktion inte kan utföras omedelbart efter att ett dött djur påfunnits, bör djuret kylas (inte frysas) vid en temperatur som är tillräckligt låg för att minimera autolys. Obduktioner ska utföras så snart som möjligt, vanligtvis inom en dag eller två. Alla betydande patologiska förändringar bör registreras för varje djur med särskild uppmärksamhet på eventuella förändringar i luftvägarna.
40. Tabell 2 visar de organ och vävnader som bör bevaras i ett lämpligt medium under obduktion för histopatologisk undersökning. Bevarandet av organ och vävnader [inom hakparentes] och eventuellt andra organ och vävnader avgörs av försöksledaren. Organen i **fetsstil** ska putsas och vägas våta så snart som möjligt efter dissektionen för att undvika uttorkning. Sköldkörteln och bitesticklarna bör endast vägas om det behövs, eftersom trimning av artefakter kan hindra en histopatologisk utvärdering. Vävnader och organ bör fixeras i 10 % buffrad formalin eller annat lämpligt fixativ så snart obduktionen utförts, och inte mindre än 24–48 timmar före trimning beroende på det fixativ som ska användas.

Tabell 2

Organ och vävnader som bevaras vid obduktion

Binjurar	Sädesblåsor
Benmärg (och/eller färskt aspirat)	Ryggmärg (cervikala, mitt på bröstkorgen och ländryggen)
Hjärna (inklusive delar av cerebrum, cerebellum och medulla/pons)	Mjälte
(Ögon [retina, synnerv] och ögonlock)	Mage
Hjärta	Testiklar
Njurar	Tymus
Larynx (3 nivåer, 1 nivå för att inkludera basen på epiglottis)	Sköldkörtel
Lever	Luftstrupe (minst 2 nivåer inklusive 1 längdsnitt genom carina och 1 tvärsnitt)
Lungor (alla lobor på en nivå, inklusive huvudbronker)	[Urinblåsa]
Lymfkörtlar från lungans hilarregion, särskilt beträffande svårslösliga partikeltestkemikalier. För mer ingående undersökningar och/eller studier med immunologi i fokus kan ytterligare lymfkörtlar beaktas, t.ex. de från de mediastinala, cervikala/submandibulära och/eller aurikulära regionerna.	Uterus
Nasofaryngeala vävnader (minst 4 nivåer; 1 nivå för att inkludera den nasofaryngeala kanalen och den nasalassocierade lymfvävnaden (NALT))	Alla större skador
Esofagus	
[Luktbulb]	
Äggstockar	

41. Lungorna bör avlägsnas intakta, vägas och indränkas med lämpligt fixativ vid ett tryck på 20–30 cm vatten för att säkerställa att lungstrukturen bibehålls (5). Sektioner bör samlas in för alla lobor på en nivå, inklusive huvudbronker, men om lungsköljning utförs ska den osköljda loben sektioneras på tre nivåer (ej seriella sektioner).
42. Minst 4 nivåer av de nasofaryngeala vävnaderna bör undersökas, varav en ska innehålla den nasofaryngeala kanalen, (5, 6, 7, 8, 9) för en adekvat undersökning av den skvamösa, mellanliggande (icke-cilierade respiratoriska), respiratoriska (cilierade respiratoriska) och luktepitelet, samt den dränerade lymfvävnaden (NALT; 10, 11). Tre nivåer av struphuvudet bör undersökas, och en av dessa nivåer bör inkludera struplockets bas (12). Minst två nivåer av luftstrupen bör undersökas, inklusive ett längdsnitt genom förgreningen av carinan för de extrapulmonella bronkerna, samt ett tvärsnitt.

HISTOPATOLOGI

43. En histopatologisk utvärdering av alla organ och vävnader som räknas upp i tabell 2 bör utformas för kontroll- och högkoncentrationsgrupperna och för alla djur som dör eller avlivas under studien. Särskild uppmärksamhet bör ges åt luftvägarna, målorganen och större skador. Organ och vävnader som har skador i högkoncentrationsgruppen bör undersökas i alla grupper. Försöksledaren kan välja att utföra histopatologiska utvärderingar av flera grupper för att påvisa en tydlig koncentrationsrespons. Om en satellitgrupp (reversibilitet) används bör en histopatologisk utvärdering göras av samtliga vävnader och organ där effekter visats i de behandlade grupperna. Om det finns alltför många tidiga dödsfall eller andra problem i högkoncentrationsgruppen som äventyrar datans signifikans, bör nästa lägre koncentration undersökas histopatologiskt. Ett försök bör göras att korrelera större observationer i relation till mikroskopiska fynd.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

44. Individuella data om djurens kroppsvikt, födointag, klinisk patologi, makroskopisk patologi, organvikter och histopatologi ska lämnas. Kliniska observationsdata bör sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antalet djur som använts, antalet djur som visar tecken på toxicitet, antalet djur som avlidit under testet eller som avlivats av humanitära skäl, tidpunkten då det enskilda djuret har avlidit, beskrivning och tidsförlopp för toxiska verkningar och reversibilitet, samt obduktionsfynd. Samtliga resultat, kvantitativa och tillfälliga, ska utvärderas genom en lämplig statistisk metod. En allmänt vedertagen statistisk metod kan användas, och statistiska metoderna bör väljas under studiens utformning.

Testrapport

45. Testrapporten ska omfatta följande information, när så är lämpligt:

Försöksdjur och djurhållning

- Beskrivning av burförhållanden, inklusive antal (eller förändring av antal) djur per bur, strö, omgivnings-temperatur och relativ fuktighet, ljusperiod och identifiering av kost.
- Art/stam som används och motivering för att använda andra arter än råtta. Källor och historiska data kan ges om de kommer från djur som har exponerats under liknande exponering, inhysning och fastebetingelser.
- Djurens antal, ålder och kön.
- Metod för randomisering.
- Beskrivning av eventuella förtestbetingelser inbegripet kost, karantän och behandling av sjukdomar.

Testkemikalie

- Fysikalisk natur, renhet och, i förekommande fall, fysikalisk-kemiska egenskaper (inbegripet isomerisering).
- Identifieringsdata och CAS-nummer (Chemical Abstract Services), om detta är känt.

Vehikel

- Motivering för användning av vehikel och valet av vehikel (om annat än vatten).
- Historiska eller parallella data som visar att vehikeln inte påverkar studiens slutresultat.

Inhalationskammare

- Detaljerad beskrivning av inhalationskammaren inklusive volym och ett diagram.
- Ursprung och beskrivning av utrustning som används för exponering av djur så väl som generering av atmosfären.
- Utrustning för mätning av temperatur, fuktighet, partikelstorlek och faktisk koncentration.
- Luftkälla och system som används för konditionering.
- Metoder som används för kalibrering av utrustning för att säkerställa en homogen testatmosfär.
- Tryckskillnad (positiv eller negativ).
- Exponeringsportar per kammare (enbart nos), placering av djur i kammaren (helkropp).

- Testatmosfärens stabilitet.
- Placering av temperatur- och fuktighetsgivare och provtagning av testatmosfären i kammaren.
- Behandling av luft som tillförs/extraheras.
- Luftflödes hastigheter, port för luftflöde och exponering (enbart nos), eller djurbelastning och kammare (helkropp).
- Tid tills inhalationskammaren har nått jämvikt (t_{95}).
- Antal volymutbyten per timme.
- Mätutrustning (i förekommande fall).

Exponeringsdata

- Grund för valet av målkoncentration i huvudstudien.
- Nominella koncentrationer (den totala massan av testkemikalien som genereras i inhalationskammaren dividerad med luftvolymen som passerar genom kammaren).
- Faktiska koncentrationer av testkemikalien som uppsamlats från djurens andningsapparat, för blandningar som bildar heterogena fysikaliska former (gaser, ångor, aerosoler), där var och en analyseras separat.
- Alla luftkoncentrationer bör redovisas i massenheter (mg/l mg/m^3 , etc.) snarare än volymenheter (ppm, ppb, etc.).
- Partikelstorleksfördelning, aerodynamisk massmediandiameter (MMAD) och geometrisk standardavvikelse (σ_g), inklusive metoderna för deras beräkning. Individuella partikelstorleksanalyser bör rapporteras.

Testbetingelser

- Uppgifter om testkemikalieberedning, inklusive uppgifter om eventuella procedurer som använts för att minska partikelstorlekarna hos fasta ämnen eller för att bereda testlösningar.
- En beskrivning (helst med ett diagram) av utrustningen som används för att generera testatmosfären och för att exponera djuren för denna atmosfär.
- Uppgifter om den utrustning som används för att övervaka kammarens temperatur, fuktighet och luftflöde (dvs. utarbetningen av en kalibreringskurva).
- Uppgifter om den utrustning som används för att samla in prover för bestämning av kammarens koncentration och partikelstorleksfördelning.
- Uppgifter om den kemiska analysmetod som används och metodvalidering (inklusive effektiviteten för återvinningen av testkemikalien från provtagningsmediet).
- Metod för randomisering av djur till test- och kontrollgrupper.
- Uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet kosttyp/-källa och vattenförsörjning).
- Grunden för valet av testkoncentration.

Resultat

- Tabelluppställning av kammarens temperatur, fuktighet och luftflöde.
- Tabelluppställning av kammarens nominella och faktiska koncentrationsdata.

- Tabelluppställning av partikelstorleksdata som omfattar provtagningsdata, partikelstorleksfördelning och beräkning av MMAD och σ_g .
- Tabelluppställning av responsdata och koncentrationsnivåer för varje djur (dvs. djur som uppvisar tecken på toxicitet inklusive mortalitet, natur, allvarlighetsgrad, tidpunkt för första tecknet och effekternas varaktighet).
- Tabelluppställning av de enskilda djurens vikt.
- Tabelluppställning av födointag.
- Tabelluppställning av kliniska patologiska data.
- Obduktionsfynd och histopatologiska fynd för varje djur, om detta finns tillgängligt.
- Tabelluppställning av eventuella andra uppmätta parametrar.

Diskussion och tolkning av resultaten

- Särskild uppmärksamhet bör ges till beskrivningen av metoderna som används för att uppfylla kriterierna för denna testmetod t.ex. koncentrationsgräns eller partikelstorlek.
- Partiklarnas andningsbarhet i ljuset av de övergripande resultaten bör behandlas, särskilt om kriterierna för partikelstorlek inte kunde uppfyllas.
- Överensstämmelsen mellan metoderna som används för att bestämma nominell och faktisk koncentration, och förhållandet mellan faktisk och nominell koncentration bör ingå i den samlade bedömningen av studien.
- Den sannolika dödsorsaken och dominerande verkningsmekanism (systematisk mot lokal) bör behandlas.
- En förklaring bör ges om det fanns behov av att avliva djur, som visade tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande, av humanitära skäl på grundval av kriterierna i OECD:s vägledningsdokument om humana endpoints (3).
- Målorganet(en) bör identifieras.
- NOAEL och LOAEL bör bestämmas.

LITTERATUR

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

-
- (8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. I: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215–263.
- (9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasala diagram: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22: 353–372.
- (10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hamelers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 13: 219–224.
- (11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Lett.* 140–141: 281–285.
- (12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3): 419–428.
- (13) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006 (Text av betydelse för EES), EUT L 353, 31.12.2008, s. 1.
-

Tillägg 1

DEFINITION

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.”

(5) Kapitlen B.29 och B.30 ska ersättas med följande:

”B.29 SUBKRONISK INHALATIONSTOXICITET: 90-DAGARSSTUDIE

SAMMANFATTNING

Denna reviderade B.29-testmetod har utformats för att till fullo karakterisera testkemikalies inhalationstoxicitet under en begränsad tidsperiod (90 dagar), och för att tillhandahålla stabila data för kvantitativa riskbedömningar. Grupper om 10 hanngagare och 10 hongnagare exponeras 6 timmar per dag under en 90-dagarsperiod (13 veckor) för a) testkemikalien vid tre eller fler koncentrationsnivåer, b) filtrerad luft (negativ kontroll, och/eller c) vehikeln (vehikelkontroll). Djur exponeras i allmänhet 5 dagar per vecka, men exponering 7 dagar per vecka är också tillåten. Hanar och honor testas alltid, men de kan exponeras vid olika koncentrationsnivåer om det är känt att ett kön är mer mottagligt för en viss testkemikalie. Denna metod ger försöksledaren flexibilitet att inkludera satellitgrupper (reversibilitet), avlivningar, lungsköljning (BAL), neurologiska tester och ytterligare utvärderingar av klinisk patologi och histopatologi för att bättre kunna karakterisera en testkemikalies toxicitet.

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje 413 (2009). Den ursprungliga testriktlinjen 413 (TG 413) för subkronisk inhalation antogs 1981 (1). Den här testmetoden B.29 (som motsvarar den reviderade testriktlinjen 413 (2009)) har uppdaterats för att återspegla vetenskapen och möta nuvarande och framtida lagstiftningsbehov.
2. Studier av subkronisk inhalationstoxicitet används främst för att härleda regulatoriska koncentrationer för bedömning av risker i arbetsmiljöer. De används också för att bedöma människors bostäder, transportmedel och miljörisker. Den här testmetoden medger karakterisering av negativa effekter efter upprepad daglig exponering genom inhalation av en testkemikalie under 90 dagar (cirka 10 % av en rätts livslängd). Datan som härrör från studier om subkronisk inhalationstoxicitet kan användas för kvantitativa riskbedömningar och för valet av koncentrationer för kroniska studier. Den här testmetoden är inte specifikt avsedd för testning av nanomaterial. Definitioner som används inom ramen för den här metoden finns i slutet av det här kapitlet och i vägledningsdokumentet (GD) 39 (2).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

3. All tillgänglig information om testkemikalien bör beaktas av laboratoriet innan studien genomförs i syfte att höja studiens kvalitet och minimera djuranvändningen. Information som underlättar valet av lämpliga testkoncentrationer kan inkludera identitet, kemisk struktur, och fysikalisk-kemiska egenskaper hos testkemikalien, resultat från eventuella in vitro- eller in vivo-toxicitetstester, förväntad användning(ar) och risken för mänsklig exponering, tillgängliga (Q)SAR-data och toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier samt data från andra studier av upprepad exponering. Om neurotoxicitet förväntas eller observeras under studiens gång, kan försöksledaren välja att inkludera lämpliga utvärderingar såsom en funktionell samlingsstudie (FOB) och mätning av motorisk aktivitet. Även om tidpunkter för exponeringar i förhållande till specifika undersökningar kan vara kritiska, bör resultaten från dessa extra aktiviteter inte störa studiens grundläggande utformning.
4. Utspädningar av korrosiva eller irriterande testkemikalier kan testas vid koncentrationer som kommer att ge den önskade graden av toxicitet. För ytterligare information se GD 39 (2). När djur utsätts för dessa material bör målkoncentrationerna vara tillräckligt låga för att inte orsaka avsevärd smärta och lidande, men ändå tillräckliga för att utsträcka koncentration-respons-kurvan till nivåer som gör att testets regulatoriska och vetenskapliga mål kan uppnås. Dessa koncentrationer bör väljas från fall till fall, företrädesvis baserade på en adekvat utformad undersökning av spännvidden som ger information om den kritiska endpointen, eventuellt tröskelvärde för irritation och tiden för de första tecknen (se punkterna 11–13). Motivering för valet av koncentration ska anges.
5. Döende djur eller djur som visar tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande ska avlivas skonsamt. Döende djur betraktas på samma sätt som de som dör under testet. Kriterier för att ta beslutet att avliva döende eller svårt lidande djur, och vägledning om hur man känner igen tecken på förutsägbar eller annalkande död, omfattas i OECD:s vägledningsdokument om humana endpoints (3).

METODBESKRIVNING

Val av djurart

6. I testet bör friska unga vuxna gnagare användas av stammar som vanligtvis används på laboratorier. För detta test används råttor. Motivering ska ges om annan art används.

Förberedelse av djuren

7. Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga. På dagen för randomiseringen bör djuren vara unga vuxna 7 till 9 veckor gamla. Kroppsvikten bör ligga inom $\pm 20\%$ av medelvikten för vardera könet. Djuren väljs ut slumpvis och märks för individuell identifikation, och får därefter akklimatisera sig till laboratoriets betingelser i sina burar i minst fem dagar före teststarten.

Djurhållning

8. Djuren bör identifieras individuellt, företrädesvis med subkutana transpondrar för att underlätta observationer och undvika förvirring. Temperaturen i försöksdjurens utrymme bör vara $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Den relativa fuktigheten bör ligga mellan 30 och 70 %, även om detta kanske inte är möjligt när vatten används som vehikel. Före och efter exponeringen bör djuren inhysas i grupper avhängigt kön och koncentration, dock får antalet djur per bur inte hindra en tydlig observation av varje enskilt djur, och förluster genom kannibalism och slagsmål bör minimeras. Om endast djurens nosar ska exponeras kan det vara nödvändigt att de får akklimatisera sig till fasthållningsrören. Fasthållningsrören ska inte medföra onödig fysisk, termisk eller fasthållningsstress för djuren. Fasthållning kan påverka fysiologiska endpoints såsom kroppstemperatur (hypotermi) och/eller minimala respiratoriska volymer. Om det finns generiska data tillgängliga som inte pekar på sådana förändringar i någon nämnvärd omfattning är det inte nödvändigt med anpassningen till rören före exponeringen. Djur vars hela kroppar ska exponeras för en aerosol ska inhysas individuellt under exponeringen för att förhindra att de andra djuren i buren filtrerar aerosolen genom sina pälsar. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, utom under exponeringen, tillsammans med en obegränsad tillgång till vatten. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker.

Inhalationskammare

9. Vid val av inhalationskammare bör man beakta kemikalies beskaffenhet och ändamålet med testet. Det föredragna exponeringssättet är enbart nos (termen inkluderar även enbart huvud, enbart nos eller enbart tryne). Exponering av enbart nos föredras i allmänhet vid studier av vätskor och fasta aerosoler och ånga som kan kondenseras och bilda aerosoler. Vissa av undersökningens mål kan bättre uppnås genom exponering av hela kroppen, men detta ska motiveras i undersökningsrapporten. För att säkerställa atmosfärisk stabilitet vid användningen av en helkroppskammare ska den totala volymen av försöksdjuren inte överskrida 5 % av kammarens volym. Teknikerna för enbart nos och helkroppsexponeringens principer och särskilda för- och nackdelar behandlas i GD 39 (2).

TOXICITETSSTUDIER

Koncentrationsgränser

10. Till skillnad från akuta studier finns det inga fastställda koncentrationsgränser i studier av subkronisk inhalationstoxicitet. För den högsta testade koncentrationen bör man beakta: 1) högsta möjliga koncentration, 2) värsta tänkbara fall av mänsklig exponering, 3) behovet av att ge en tillräcklig syretillförsel och/eller 4) djurskyddsskäl. I avsaknad av databaserade gränsvärden, får de akuta gränsvärdena i förordning (EG) nr 1272/2008 (13) användas (dvs. upp till en högsta koncentration av 5 mg/l för aerosoler, 20 mg/l för ångor och 20 000 ppm för gaser); se GD 39 (2). Motivering ska ges om det är nödvändigt att överskrida dessa gränsvärden vid testning av gaser eller mycket flyktiga testkemikalier (t.ex. köldmedier). Koncentrationsgränsen bör framkalla tydlig toxicitet utan att utsätta djuren för onödig stress eller påverka deras livslängd (3).

Spännviddsstudie

11. Innan huvudstudien påbörjas är det i allmänhet nödvändigt att genomföra en spännviddsstudie. En spännviddsstudie är mer omfattande än en inledande studie eftersom den inte är begränsad till valet av koncentration. Kunskap från en spännviddsstudie kan leda till en lyckad huvudstudie. En spännviddsstudie kan till exempel ge teknisk information om analysmetoder, partikeldimensionering, upptäckt av toxiska mekanismer, klinisk patologi- och histopatologidata, och en uppskattning av vad som kan vara NOAEL- och MTC-koncentrationer i en huvudstudie. Försöksledaren kan välja att använda en spännviddsstudie för att identifiera tröskelvärdet för irritation i luftvägarna (t.ex. med histopatologi i luftvägarna, lungfunktionstest eller lungsköljning), den övre koncentration som tolereras utan att djuren utsätts för onödig stress och de parametrar som bäst kännetecknar en testkemikalies toxicitet.

12. En spännviddsstudie kan bestå av en eller flera koncentrationsnivåer. Beroende på de endpoints som valts bör 3 till 6 hanar och 3 till 6 honor exponeras vid varje koncentrationsnivå. En spännviddsstudie ska pågå under minst 5 dagar och vanligtvis inte mer än i 28 dagar. Motiveringen för valet av koncentrationer till huvudstudien ska ges i undersökningsrapporten. Syftet med huvudstudien är att påvisa ett koncentration-respons-förhållande baserat på vad som förväntas vara den mest känsliga endpointen. Den låga koncentrationen bör helst vara en koncentration utan en påvisbar skadlig effekt medan den höga koncentrationen bör framkalla tydlig toxicitet utan att utsätta djuren för onödigt stress eller påverka deras livslängd (3).
13. Vid valet av koncentrationsnivåer för spännviddsstudien bör all tillgänglig information beaktas, inklusive struktur-aktivitetsförhållanden samt data för liknande kemikalier (se punkt 3). En spännviddsstudie kan verifiera/motbevisa vad som anses vara de endpoints som är mest mekanistiskt baserade, t.ex. kolinesterasinhibition av organiska fosforföreningar, methemoglobinbildning av erytrocytotoxiska agens, sköldkörtelhormoner (T₃, T₄) för tyreotoxiska ämnen, protein, LDH eller neutrofiler i bronkoalveolar sköljning för ofarliga svårslösliga partiklar eller lungretande aerosoler.

Huvudstudie

14. Huvudstudien för subkronisk toxicitet består i allmänhet av tre koncentrationsnivåer och även samtidiga negativa (luft) och/eller vehikelkontroller efter behov (se punkt 18). Alla tillgängliga data bör användas för att underlätta valet av lämpliga exponeringsnivåer, inklusive resultaten från de systematiska toxicitetsstudierna, metabolism och kinetik (särskild vikt bör läggas vid att undvika höga koncentrationsnivåer som mättar kinetiska processer). Varje testgrupp består av 10 hangnagare och 10 hongnagare som exponeras för testkemikalien 6 timmar per dag 5 dagar per vecka under en period på 13 veckor (total studielängd minst 90 dagar). Djuren kan också exponeras 7 dagar per vecka (t.ex. vid testning av läkemedel som inhaleras. Om ett kön är känt för att vara mer mottagligt för en viss testkemikalie kan könen exponeras vid olika koncentrationsnivåer för att optimera koncentrationsresponsen enligt beskrivningen i punkt 15. Om andra gnagare än råttor exponeras enbart nos, får maximala exponeringstider justeras för att minska artspecifikt lidande. En motivering bör ges när man använder kortare exponeringstid än 6 timmar/dag, eller när det är nödvändigt att utföra en helkroppsexponeringsstudie med lång varaktighet (t.ex. 22 timmar/dag) (se GD 39) (2). Inget foder ska ges under exponeringsperioden, om den inte överskrider 6 timmar. Vatten kan tillhandahållas under en helkroppsexponering.
15. Den målkoncentration som valts ska identifiera målorgan(en) och påvisa en tydlig koncentrationsrespons:
 - Den höga koncentrationsnivån bör leda till toxiska effekter, men inte orsaka kvardröjande tecken eller dödlighet, vilket kan förhindra en meningsfull utvärdering.
 - Den mellanliggande koncentrationsnivån(erna) bör spridas ut för gradering av toxiska effekter mellan den låga och höga koncentrationen.
 - Den låga koncentrationsnivån bör frambringa få eller inga belägg för toxicitet.

Avlivande

16. Om avlivning planeras ska antalet djur vid varje exponeringsnivå ökas med det antal som ska avlivas före studiens avslutande. Motiveringen för att använda avlivningar bör tillhandahållas samt statistiska analyser som stöder dem.

Satellitstudie (reversibilitet)

17. En satellitstudie (reversibilitet) kan användas för att observera reversibilitet, persistens eller fördröjd toxicitet för en efterbehandlingsperiod av lämplig längd, dock inte mindre än 14 dagar. Satellitgrupper (reversibilitet) består av 10 hanar och 10 honor som exponeras samtidigt med försöksdjuren i huvudstudien. Satellitstudiegrupper bör exponeras för testkemikalien vid den högsta koncentrationsnivån och det bör finnas samtidiga luft- och/eller vehikelkontroller efter behov (se punkt 18).

Kontrolldjur

18. Samtidiga negativa (luft-) kontrolldjur bör hanteras på ett sätt som är identiskt med djuren i testgruppen, förutom att de exponeras för filterad luft i stället för testkemikalien. När vatten eller annat ämne används för att generera testatmosfären bör en vehikelkontrollgrupp i stället för en negativ (luft-) kontrollgrupp ingå i studien. Vatten bör användas som vehikel närhelst det är möjligt. När vatten används som vehikel bör kontrolldjuren exponeras för luft med samma relativa fuktighet som de exponerade grupperna. Valet av en lämplig

vehikel bör grunda sig på en lämpligt utförd förstudie eller historiska data. Om en vehikels toxicitet inte är känd kan försöksledaren välja att använda både en negativ (luft-) kontroll och en vehikelkontroll, men det rekommenderas inte. Om historiska data visar att en vehikel inte är toxisk finns det inget behov av en negativ (luft-) kontrollgrupp och då bör endast en vehikelkontroll användas. Om en förstudie av en testkemikalie som beretts i en vehikel inte visar någon toxicitet, framgår det att vehikeln inte är toxisk vid den testade koncentrationen och att denna vehikelkontroll bör användas.

EXPONERINGSBETINGELSER

Administration av koncentrationer

19. Djur exponeras för testkemikalien som en gas, ånga, aerosol eller en blandning av dem. Det fysikaliska tillstånd som ska testas beror på testkemikalien fysikalisk-kemiska egenskaper, valda koncentrationer och/eller dess mest sannolika fysikaliska form vid hanteringen och användningen. Hygroskopiska och kemiskt reaktiva testkemikalier ska testas i torr luft. Det är viktigt att se till att inga explosiva koncentrationer skapas. För att minska partikelstorleken kan partikelmaterialet utsättas för mekaniska processer. Mer vägledning finns i GD 39 (2).

Partikelstorleksfördelning

20. Partikeldimensionering bör utföras för alla aerosoler och ångor som kan kondenseras och bilda aerosoler. För att möjliggöra exponering av alla relevanta områden i luftvägarna, rekommenderas aerosoler med en aerodynamisk diameter (MMAD) i intervallet 1 till 3 µm med en geometrisk standardavvikelse (σ_g) i intervallet 1,5 till 3,0 (4). Även om en rimlig ansträngning krävs för att uppfylla denna standard, bör en sakkunnig bedömning ges om detta inte kan uppnås. Till exempel blir rökpartiklar av metall mindre än denna standard, och laddade partiklar och fibrer kan överstiga den.

Beredning av testkemikalie i en vehikel

21. Testkemikalien ska helst testas utan en vehikel. Om det är nödvändigt att använda en vehikel för att generera en lämplig koncentration och partikelstorlek av testkemikalien, bör vatten ges företräde. Närhelst en testkemikalie är upplöst i en vehikel ska dess stabilitet påvisas.

ÖVERVAKNING AV EXPONERINGSFÖRHÅLLANDEN

Kammarens luftflöde

22. Luftflödet genom exponeringskammaren ska omsorgsfullt kontrolleras, kontinuerligt övervakas och registreras minst en gång i timmen under varje exponering. Övervakningen i realtid av testatmosfärens koncentration (eller temporal stabilitet) är en integrerad mätning av samtliga dynamiska parametrar och ger ett indirekt sätt att kontrollera alla relevanta dynamiska inhalationsparametrar. Om koncentrationen övervakas i realtid kan mätfrekvensen för luftflöden minskas till en enda mätning per exponeringsdag. Särskild hänsyn bör tas för att undvika återandning i enbart nos-kammare. Syrehalten bör vara minst 19 % och koncentrationen av koldioxid bör inte överstiga 1 %. Om det finns anledning att tro att denna standard inte kan uppfyllas bör man mäta koncentrationen av syre och koldioxid. Om mätningar under den första exponeringsdagen visar att dessa gaser har korrekta nivåer behöver inga fler mätningar utföras.

Kammarens temperatur och relativa fuktighet

23. Kammarens temperatur bör upprätthållas vid 22 ± 3 °C. Relativ fuktighet i djurens andningsapparater, för både enbart nos och helkroppsexponering, bör övervakas kontinuerligt och registreras varje timme vid varje exponering, om möjligt. Den relativa fuktigheten bör helst upprätthållas inom intervallet 30 till 70 %, men detta kanske inte är möjligt (t.ex. vid testning av vattenbaserade blandningar), eller inte mätbart på grund av att testkemikalien stör själva testmetoden.

Testkemikalie: Nominell koncentration

24. När det är möjligt bör den nominella koncentrationen i exponeringskammaren beräknas och registreras. Den nominella koncentrationen är massan av den genererade testkemikalien dividerad med den totala volymen av luft som passerade genom inhalationskammarsystemet. Den nominella koncentrationen används inte för att karakterisera djurens exponering, men en jämförelse mellan den nominella koncentrationen och den faktiska koncentrationen ger en indikation på testsystemets genereringsprestanda, och kan därmed användas för att upptäcka genereringsproblem.

Testkemikalie: Faktisk koncentration

25. Den faktiska koncentrationen är testkemikaliekoncentrationen som samlats in i djurets andningsområde i en inhalationskammare. Faktiska koncentrationer kan erhållas antingen genom särskilda metoder (t.ex. direkt provtagning, adsorptiva eller kemiskt reaktiva metoder, och efterföljande analytisk karakterisering) eller genom icke-specifika metoder såsom gravimetrisk filteranalys. Användningen av gravimetrisk analys är endast acceptabel för pulveraerosoler bestående av en enda komponent eller aerosoler bestående av vätskor med låg flyktighet, och bör stödjas av en lämplig preklinisk studie med kemikaliespecifik karakterisering. Koncentrationen i pulveraerosoler bestående av flera komponenter kan också bestämmas genom gravimetrisk analys. Detta kräver dock analysresultat som visar att sammansättningen av luftburet material liknar startmaterialet. Om denna information inte finns tillgänglig kan det vara nödvändigt med en ny analys av testkemikalien (helst i sitt luftburna tillstånd) under loppet av studien. För medel i aerosolform som kan förångas eller sublimeras bör man kunna visa att samtliga faser uppsamlades med den valda metoden.
26. En sats av testkemikalien ska användas genom hela studien, om möjligt, och provet ska lagras under sådana förhållanden att det bibehåller sin renhet, homogenitet och stabilitet. Inför starten av studien bör det finnas en beskrivning av testkemikalien som inbegriper dess renhet och, om det är tekniskt genomförbart, identitet, och kvantiteterna av identifierade föroreningar och orenheter. Detta kan visas genom, men är inte begränsat till, följande data: retentionstid och relativ topparea, molekylvikt från masspektroskopi eller gaskromatografianalys, eller andra uppskattningar. Även om testlaboratoriet inte ansvarar för provets identitet, kan det vara klokt att man i stora drag bekräftar karakteriseringen (t.ex. färg, fysisk natur etc.).
27. Exponeringsatmosfären ska hållas så konstant som möjligt. En enhet för realtidsövervakning, såsom en aerosolfotometer för aerosoler eller en analysator för totalolväte för ångor kan användas för att påvisa stabiliteten för exponeringsförhållandena. Faktisk kammarkoncentration bör mätas minst 3 gånger varje exponeringsdag vid varje exponeringsnivå. Om det inte är möjligt på grund av begränsade luftflöden eller låga koncentrationer, är det acceptabelt med ett prov per exponeringsperiod. Helst ska detta prov sedan samlas in under hela exponeringsperioden. Provtagning av kammarkoncentrationer från individuella kammare bör inte avvika från den genomsnittliga koncentrationen med mer än $\pm 10\%$ för gaser och ångor, och inte med mer än $\pm 20\%$ för flytande eller fasta aerosoler. Tid för att uppnå kammarjämvikt (t_{95}) bör beräknas och rapporteras. Varaktigheten för en exponering sträcker sig över den tid som testkemikalien genereras. Detta tar hänsyn till den tid som krävs för att uppnå kammarens jämvikt (t_{95}) och sönderfall. Riktlinjer för att uppskatta t_{95} finns i GD 39 (2).
28. För mycket komplexa blandningar bestående av gaser/ångor och aerosoler (t.ex. förbränningsatmosfärer och testkemikalier framdrivna från därför avsedd slutanvändningsprodukt/-utrustning) kan varje fas bete sig olika i en inhalationskammare. Därför ska minst ett indikatorämne väljas (analyt), vanligtvis den huvudsakliga aktiva ingrediensen i blandningen för varje fas (gas/ånga och aerosol). När testkemikalien är en blandning ska den analytiska koncentrationen i totalblandningen rapporteras, inte bara den aktiva ingrediensen eller indikatorämnet (analyten). Ytterligare information om faktisk koncentration finns i GD 39 (2).

Testkemikalie: Partikelstorleksfördelning

29. Aerosolers partikelstorleksfördelning bör fastställas minst en gång i veckan vid varje koncentrationsnivå med hjälp av en kaskadimpaktor eller ett alternativt instrument såsom en aerodynamisk partikelsorterare (APS). Om man kan visa ett likvärdigt resultat från en kaskadimpaktor och det alternativa instrumentet, kan man använda det sistnämnda under hela studien.
30. En andra enhet, till exempel ett gravimetriskt filter eller en impinger/gasbubblare, bör användas parallellt med det primära instrumentet för att bekräfta uppsamlingsprestandan hos det primära instrumentet. Masskoncentrationen som erhållits genom analys av partikelstorleken ska ligga inom rimliga gränser för den masskoncentration som erhållits genom filteranalys (se GD 39 (2)). Om likvärdigheten kan påvisas för alla koncentrationer som testats i ett tidigt skede av försöket, kan ytterligare bekräftande mätningar utelämnas. Av hänsyn till djurskyddsskäl bör åtgärder vidtas för att minimera ofullständiga uppgifter som kan leda till att studien måste upprepas.
31. Partikeldimensionering bör utföras för ångor om det finns en möjlighet att kondensen kan bilda en aerosol, eller om partiklar upptäcks i ångatmosfären som kan göra så att faserna blandas.

IAKTTAGELSER

32. Djuren bör observeras kliniskt före, under och efter exponeringsperioden. Mer frekventa iakttagelser kan indikeras beroende på djurens respons under exponeringen. När iakttagelser av djuren hindras genom användning av fasthållningsrör, dåligt upplysta kroppskammare eller ogenomskinlig atmosfär, bör djuren noga observeras efter exponeringen. Observationer före nästa dags exponering kan utvärdera eventuell reversibilitet eller stegrande toxiska effekter.
33. Alla observationer registreras med individuell registrering för varje djur. När djur avlivas av humanitära skäl eller påträffas döda, ska tidpunkten för dödsfallet registreras så noggrant som möjligt.
34. Observationer vid buren bör omfatta förändringar i hud och päls, ögon och slemhinnor, förändringar i andnings- och cirkulationssystemen, förändringar i nervsystemet, samt förändringar i kroppsmotorik och beteendemönster. Uppmärksamhet bör fästas vid iakttagelser av tremor, konvulsioner, salivutsöndring, diarré, letargi, sömn och koma. Mätningen av rektala temperaturer kan ge belägg för bradypnéreflex eller hypo/hypertermi relaterat till behandling eller inspärning. Ytterligare utvärderingar kan inkluderas i studiens protokoll såsom kinetik, biologisk övervakning, lungfunktion, retention av svårslösliga ämnen som ackumuleras i lungvävnad, samt beteendeförändringar.

KROPPSVIKT

35. De enskilda djurens vikt bör registreras strax före den första exponeringen (dag 0), därefter två gånger i veckan (till exempel på fredagar och måndagar för att påvisa återhämtning över ett exponeringsfritt veckoslut, eller under ett tidsintervall för bedömning av systematisk toxicitet), och vid tidpunkten för dödsfallet eller avlivningen. Om inga effekter visas under de 4 första veckorna kan kroppsvikterna mätas en gång i veckan för återstoden av studien. Satellitdjur (reversibilitet) (om det används) ska fortsätta vägas varje vecka under hela återhämtningsperioden. Vid studiens upphörande bör samtliga djur vägas strax före avlivningen för en objektiv beräkning av förhållandet organ-kroppsvikt.

FÖDO- OCH VATTENINTAG

36. Födointaget bör mätas varje vecka. Vattenintaget bör också mätas.

KLINISK PATOLOGI

37. Kliniska patologiska bedömningar bör göras av samtliga djur, inklusive kontroll- och satellitdjur (reversibilitet) när de avlivas. Tidsintervallet mellan exponeringens upphörande och insamlingen av blod ska registreras, i synnerhet när rekonstitueringen av endpointen är snabb. Provtagning efter att exponeringen har upphört indikeras för dessa parametrar med ett kort plasmaproov halvtid (t.ex. COHb, CHE och MetHb).
38. Tabell 1 listar de kliniska patologiska parametrar som i allmänhet krävs för alla toxikologiska studier. Urinalanalys krävs inte rutinmässigt, men kan utföras när det bedöms lämpligt utifrån förväntad eller observerad toxicitet. Försöksledaren kan välja att bedöma ytterligare parametrar för att bättre kunna karakterisera en testkemikalies toxicitet (t.ex. kolinesteras, lipider, hormoner, syra/bas-balans, methemoglobin eller Heinz-kroppar, kreatinkinase, myeloid/erytroid-förhållande, troponiner, arteriella blodgaser, laktatdehydrogenas, sorbitaldehydrogenas, glutamatdehydrogenas och gamma-glutamyltranspeptidas).

Tabell 1

Standardiserade parametrar för klinisk patologi

Hematologi	
Erytrocytantal	Totalt antal leukocyter
Hematokrit	Differentalt leukocytantal
Hemoglobinkoncentration	Trombocytantal
Medelvärde för korpuskulärt hemoglobin	Koaguleringsförmåga (välj ett alternativ):
Medelvärde för korpuskulär volym	— Protrobintid
Medelvärde för korpuskulär hemoglobinkoncentration	— Koagulationstid
Retikulocyter	— Partiell tromboplastintid

Klinisk kemi	
Glukos (*)	Alaninaminotransferas
Totalkolesterol	Aspartataminotransferas
Triglycerider	Alkaliskt fosfatas
Blodureakväve	Kalium
Total bilirubin	Natrium
Kreatinin	Kalcium
Totalprotein	Fosfor
Albumin	Klorid
Globulin	
Urinalys (valfritt)	
Utseende (färg och grumlighet)	Totalprotein
Volym	Glukos
Specifik vikt eller osmolalitet	Blod/blodceller
pH	

(*) Eftersom en lång fasteperiod kan införa partiskhet i glukosmätningar för de behandlade djuren jämfört med kontroldjuren, bör försöksledaren avgöra om det är lämpligt att djuren fastar. Om man använder en fasteperiod bör den vara avpassad för den art som används, för råttan kan det vara 16 timmar (fastande över natten). Bestämning av fasteglukos kan utföras efter en natts fasta under den sista exponeringsveckan, eller efter en natts fasta innan obduktionen (i det senare fallet tillsammans med alla andra kliniska patologiska parametrar).

39. När det finns bevis på att de nedre luftvägarna (dvs. alveolerna) är den främsta platsen för deponering och lagring, då kan lungsköljning vara det tekniska valet för att kvantitativt analysera hypotesbaserade doseffektparametrar med fokus på alveolit, lunginflammation och fosfolipidos. Detta gör att dosrespons och tidsförlopps-förändringar för alveolär skada grundligt kan undersökas. BAL-vätskan kan analyseras för totalt och differentiellt leukocytantal, totalprotein och laktatdehydrogenas. Andra parametrar som kan beaktas är de som tyder på lysosomal skada, fosfolipidos, fibros, och irriterande eller allergisk inflammation som kan innefatta bestämning av pro-inflammatoriska cytokiner/kemokiner. BAL-mätningar kompletterar i allmänhet resultaten från histopatologiska undersökningar, men kan dock inte ersätta dem. Vägledning om hur man utför lungsköljning finns i GD 39 (2).

OFTALMOLOGISK UNDERSÖKNING

40. Med ett oftalmoskop eller motsvarande anordning bör oftalmologiska undersökningar av fundus, brytningsmedia, iris och konjunktival utföras på samtliga djur före administreringen av testkemikalien, och för samtliga högkoncentrations- och kontrollgrupper vid avlivning. Om förändringar i ögonen upptäcks, ska samtliga djur i de andra grupperna undersökas, inklusive satellitgruppen (reversibilitet).

MAKROSKOPISK PATOLOGI OCH ORGANVIKTER

41. Samtliga försöksdjur, inklusive de som avlider under testet eller avlivas och tas bort från undersökningen av djurskyddsskäl, bör underkastas fullständig blodtömning (om möjligt) och obduceras. Tidsperioden mellan slutfasen av varje djurs exponering och dess avlivning ska registreras. Om en obduktion inte kan utföras omedelbart efter att ett dött djur påfunnits, bör djuret kylas (inte frysas) vid en temperatur som är tillräckligt låg för att minimera autolys. Obduktioner ska utföras så snart som möjligt, vanligtvis inom en dag eller två. Alla betydande patologiska förändringar bör registreras för varje djur med särskild uppmärksamhet på eventuella förändringar i luftvägarna.
42. Tabell 2 visar de organ och vävnader som bör bevaras i ett lämpligt medium under obduktion för histopatologisk undersökning. Bevarandet av organ och vävnader [inom hakparentes] och eventuellt andra organ och vävnader avgörs av försöksledaren. Organen i **fetsstil** ska putsas och vägas våta så snart som möjligt efter dissektionen för att undvika uttorkning. Sköldkörteln och bitestiklarna bör endast vägas om det behövs, eftersom trimning av artefakter kan hindra en histopatologisk utvärdering. Vävnader och organ bör fixeras i 10 % buffrad formalin eller annat lämpligt fixativ så snart obduktionen utförts, och inte mindre än 24–48 timmar före trimning beroende på det fixativ som ska användas.

Tabell 2

Organ och vävnader som bevaras vid obduktion

Binjurar	Esofagus
Aorta	[Luktbulb]
Benmärg (och/eller färskt aspirat)	Äggstockar
Hjärna (inklusive delar av cerebrum, cerebellum och medulla/pons)	Pankreas
Cekum	Bikölkörtlar
Kolon	Perifer nerv (ischias eller tibia), helst nära muskeln)
Tolvfingertarm	Hypofys
[Epididymis]	Prostata
(Ögon [retina, synnerv] och ögonlock)	Rektum
Lårbenet och knäleden	Spottkörtlar
Gallblåsa (i förekommande fall)	Sädesblåsor
[Harderiankörtlar]	Hud
Hjärta	Ryggmärg (cervikala, mitt på bröstkorgen och ländryggen)
Ileum	Mjälte
Jejunum	Bröstben
Njurar	Mage
[Tårkörtlar (extraorbitala)]	Tänder
Larynx (3 nivåer inklusive struplockets bas)	Testiklar
Lever	Tymus
Lungor (alla lobar på en nivå, inklusive huvudbronker)	Sköldkörtlar
Lymfkörtlar från lungans hilarregion, särskilt beträffande svårslösliga partikeltestkemikalier. För mer ingående undersökningar och/eller studier med immunologi i fokus kan ytterligare lymfkörtlar beaktas, t.ex. de från de mediastinala, cervikala/submandibulära och/eller aurikulära regionerna	[Tunga]
Lymfkörtlar (distalt från ingångshålet)	Luftstrupe (minst 2 nivåer inklusive 1 längdsnitt genom carina och 1 tvärsnitt)
Mjölkkörtlar (honor)	[Ureter]
Muskel (lår)	[Uretra]
Nasofaryngeala vävnader (minst 4 nivåer; 1 nivå för att inkludera den nasofaryngeala kanalen och den nasalassocierade lymfvävnaden (NALT))	Urinblåsa
	Uterus
	Målorgan
	Alla större skador och massor

43. Lungorna bör avlägsnas intakta, vägas och indränkas med lämpligt fixativ vid ett tryck på 20–30 cm vatten för att säkerställa att lungstrukturen bibehålls (5). Sektioner bör samlas in för alla lobar på en nivå, inklusive huvudbronker, men om lungsköljning utförs ska den osköjljda loben sektioneras på tre nivåer (ej seriella sektioner).

44. Minst 4 nivåer av nasofaryngeala vävnader bör undersökas, varav en ska innehålla den nasofaryngeala kanalen (5) (6) (7) (8) (9) för en adekvat undersökning av den skvamösa, mellanliggande (icke-cilierade respiratoriska), respiratoriska (cilierade respiratoriska) och luktepitelet, och den dränerade lymfvävnaden (NALT((10) (11)). Tre nivåer av struphuvudet bör undersökas, och en av dessa nivåer bör inkludera struplockets bas (12). Minst två nivåer av luftstrupen bör undersökas, inklusive ett längdsnitt genom förgreningen av carinan för de extrapulmonella bronkerna, samt ett tvärsnitt.

HISTOPATOLOGI

45. En histopatologisk utvärdering av alla organ och vävnader som räknas upp i tabell 2 bör utformas för kontroll- och högkoncentrationsgrupperna och för alla djur som dör eller avlivas under studien. Särskild uppmärksamhet bör ges åt luftvägarna, målorganen och större skador. Organ och vävnader som har skador i högkoncentrationsgruppen bör undersökas i alla grupper. Försöksledaren kan välja att utföra histopatologiska utvärderingar av flera grupper för att påvisa en tydlig koncentrationsrespons. Om en satellitgrupp (reversibilitet) används bör en histopatologisk utvärdering göras av samtliga vävnader och organ där effekter visats i de behandlade grupperna. Om det finns alltför många tidiga dödsfall eller andra problem i högkoncentrationsgruppen som äventyrar datans signifikans, bör nästa lägre koncentration undersökas histopatologiskt. Ett försök bör göras att korrelera större observationer i relation till mikroskopiska fynd.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

46. Individuella data om djurens kroppsvikt, födointag, klinisk patologi, makroskopisk patologi, organvikter och histopatologi ska lämnas. Kliniska observationsdata bör sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antalet djur som använts, antalet djur som visar tecken på toxicitet, antalet djur som avlidit under testet eller som avlivats av humanitära skäl, tidpunkten då det enskilda djuret har avlidit, beskrivning och tidsförlopp för toxiska verkningar och reversibilitet, samt obduktionsfynd. Samtliga resultat, kvantitativa och tillfälliga, ska utvärderas genom en lämplig statistisk metod. En allmänt vedertagen statistisk metod kan användas, och statistiska metoderna bör väljas under studiens utformning.

Testrapport

47. Testrapporten ska omfatta följande information, när så är lämpligt:

Försöksdjur och djurhållning

- Beskrivning av burförhållanden, inklusive antal (eller förändring av antal) djur per bur, strö, omgivnings-temperatur och relativ fuktighet, ljusperiod och identifiering av kost.
- Art/stam som används och motivering för att använda andra arter än råttor. Källor och historiska data kan tillhandahållas om de är från djur som har exponerats under liknande exponering, inhysning och fastebetingelser.
- Djurens antal, ålder och kön.
- Metod för randomisering.
- Beskrivning av eventuella förtestbetingelser inbegripet kost, karantän och behandling av sjukdomar.

Testkemikalie

- Fysikalisk natur, renhet och, i förekommande fall, fysikalisk-kemiska egenskaper (inbegripet isomerisering).
- Identifieringsdata och CAS-nummer (Chemical Abstract Services), om detta är känt.

Vehikel

- Motivering för användning av vehikel och valet av vehikel (om annat än vatten).
- Historiska eller parallella data som visar att vehikeln inte påverkar studiens slutresultat.

Inhalationskammare

- Detaljerad beskrivning av inhalationskammaren inklusive volym och ett diagram.
- Ursprung och beskrivning av utrustning som används för exponering av djur så väl som generering av atmosfär.
- Utrustning för mätning av temperatur, fuktighet, partikelstorlek och faktisk koncentration.
- Luftkälla och system som används för konditionering.
- Metoder som används för kalibrering av utrustning för att säkerställa en homogen testatmosfär.
- Tryckskillnad (positiv eller negativ).
- Exponeringsportar per kammare (enbart nos), placering av djur i kammaren (helkropp).
- Testatmosfärens stabilitet.
- Placering av temperatur- och fuktighetsgivare och provtagning av testatmosfären i kammaren.
- Behandling av luft som tillförs/extraheras.
- Luftflödes hastigheter, port för luftflöde och exponering (enbart nos), eller djurbelastning och kammare (helkropp).
- Tid tills inhalationskammaren har nått jämvikt (t_{95}).
- Antal volymutbyten per timme.
- Mätutrustning (i förekommande fall).

Exponeringsdata

- Grund för valet av målkoncentration i huvudstudien.
- Nominella koncentrationer (den totala massan av testkemikalien som genereras i inhalationskammaren dividerad med luftvolymen som passerar genom kammaren).
- Faktiska koncentrationer av testkemikalien som uppsamlats från djurens andningsapparat, för blandningar som bildar heterogena fysikaliska former (gaser, ångor, aerosoler), där var och en analyseras separat.
- Alla luftkoncentrationer bör redovisas i massenheter (mg/l , mg/m^3 , etc.) snarare än volymenheter (ppm, ppb, etc.).
- Partikelstorleksfördelning, aerodynamisk massmediandiameter (MMAD) och geometrisk standardavvikelse (σ_g), inklusive metoderna för deras beräkning. Individuella partikelstorleksanalyser bör rapporteras.

Testbetingelser

- Uppgifter om beredning av testkemikalien, inklusive uppgifter om eventuella procedurer som använts för att minska partikelstorleken hos fasta material eller för att bereda testlösningar.
- En beskrivning (helst med ett diagram) av utrustningen som används för att generera testatmosfären och för att exponera djuren för denna atmosfär.
- Uppgifter om den utrustning som används för att övervaka kammarens temperatur, fuktighet och luftflöde (dvs. utarbetningen av en kalibreringskurva).
- Uppgifter om den utrustning som används för att samla in prover för bestämning av kammarens koncentration och partikelstorleksfördelning.
- Uppgifter om den kemiska analysmetod som används och metodvalidering (inklusive effektiviteten för återvinningen av testkemikalien från provtagningsmediet).

- Metod för randomisering av djur till test- och kontrollgrupper.
- Uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet kosttyp/-källa och vattenförsörjning).
- Grunden för valet av testkoncentration.

Resultat

- Tabelluppställning av kammarens temperatur, fuktighet och luftflöde.
- Tabelluppställning av kammarens nominella och faktiska koncentrationsdata.
- Tabelluppställning av partikelstorleksdata som omfattar provtagningsdata, partikelstorleksfördelning och beräkning av MMAD och σ_g .
- Tabelluppställning av responsdata och koncentrationsnivåer för varje djur (dvs. djur som uppvisar tecken på toxicitet inklusive mortalitet, natur, allvarlighetsgrad, tidpunkt för första tecknet och effekternas varaktighet).
- Tabelluppställning av de enskilda djurens vikt.
- Tabelluppställning av födointag.
- Tabelluppställning av kliniska patologiska data.
- Obduktionsfynd och histopatologiska fynd för varje djur, om detta finns tillgängligt.

Diskussion och tolkning av resultaten

- Särskild uppmärksamhet bör ges till beskrivningen av metoderna som används för att uppfylla kriterierna för denna testmetod t.ex. koncentrationsgräns eller partikelstorlek.
- Partiklarnas andningsbarhet i ljuset av de övergripande resultaten bör behandlas, särskilt om kriterierna för partikelstorlek inte kunde uppfyllas.
- Överensstämmelsen mellan metoderna som används för att bestämma nominell och faktisk koncentration, och förhållandet mellan faktisk och nominell koncentration bör ingå i den samlade bedömningen av studien.
- Den sannolika dödsorsaken och dominerande verkningsmekanism (systematisk mot lokal) bör behandlas.
- En förklaring bör ges om det fanns behov av att avliva djur, som visade tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande, av humanitära skäl på grundval av kriterierna i OECD:s vägledningsdokument om humana endpoints (3).
- Målorganet(en) bör identifieras.
- NOAEL och LOAEL bör bestämmas.

LITTERATUR

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

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

Tillägg 1

DEFINITION

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

B.30 STUDIER AV KRONISK TOXICITET

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 452 (2009). Den ursprungliga TG 452 antogs 1981. Utvecklingen av denna reviderade testmetod B.30 ansågs nödvändig för att återspegla den senaste utvecklingen inom djurskydd och myndighetskrav (1) (2) (3) (4). Uppdateringen av denna testmetod B.30 har genomförts parallellt med revideringen av kapitel B.32 i denna bilaga, karcinogenicitetsstudier, och kapitel B.33 i denna bilaga, i syfte att erhålla ytterligare information om djuren som används i studien och ge ytterligare detaljer om val av dos. Den här testmetoden är avsedd att användas vid testning av ett brett spektrum av kemikalier, inklusive bekämpningsmedel och industrikemikalier.
2. Majoriteten av kroniska toxicitetsstudier genomförs med gnagare, och den här testmetoden är främst avsedd för studier som genomförs med dessa arter. Skulle sådana studier krävas för icke-gnagare gäller också de principer och förfaranden som beskrivs i denna testmetod, tillsammans med dem i kapitel B.27 i denna bilaga, 90-dagars oral toxicitetsstudie på icke-gnagare (5), med lämpliga ändringar som beskrivs i OECD:s vägledningsdokument nr 116 om utformning och genomförande av studier om kronisk toxicitet och karcinogenicitet (6).
3. De tre huvudsakliga administreringssätten som används i kroniska toxicitetsstudier är oral, dermal och inhalation. Valet av administreringssätt beror på de fysikaliska och kemiska egenskaperna hos testkemikalien och det dominerande exponeringssättet för människor. Ytterligare information om val av exponeringssätt ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 (6).
4. Den här testmetoden fokuserar på exponering via den orala vägen, den väg som används mest i kroniska toxicitetsstudier. Även om långsiktiga kroniska toxicitetsstudier som medför exponering via hud eller inhalation kan vara nödvändiga för riskbedömning av människors hälsa och/eller kan krävas under vissa regelverk, så innebär båda exponeringsvägarna en betydande teknisk komplexitet. Sådana studier måste utformas från fall till fall, även om testmetoden som beskrivs här för bedömningen och utvärderingen av kronisk toxicitet skulle kunna utgöra grunden för ett protokoll för inhalations- och/eller hudstudier, med hänsyn tagen till rekommendationer om behandlingsperioder, kliniska eller patologiska parametrar etc. OECD:s vägledning finns tillgänglig om administrering av testkemikalier genom inhalation (6) (7) och via huden (6). Kapitel B.8 i denna bilaga (8) och kapitel B.29 i denna bilaga (9), tillsammans med OECD:s vägledningsdokument om testning av akut inhalation (7), bör särskilt rådfrågas vid utformningen av långsiktiga studier som inbegriper exponering via inhalation. Kapitel B.9 i denna bilaga (10) bör rådfrågas när det gäller testning som utförs via huden.
5. Studien om kronisk toxicitet ger information om möjliga hälsofaror som sannolikt kan uppstå vid upprepade exponering över en stor del av livslängden för de arter som används. Studien kommer att ge information om de toxiska effekterna hos testkemikalien, samt indikation om målorgan och möjlig ackumulering. Den kan också ge en uppskattning om de icke-observerade nivåerna för skadliga biverkningar som kan användas för att fastställa säkerhetskriterier för exponering av människor. Behovet av noggranna kliniska observationer av djuren i syfte att få fram så mycket information som möjligt betonas också.
6. Målen för de studier som omfattas av denna testmetod inkluderar:
 - Identifieringen av den kroniska toxiciteten för en testkemikalie.
 - Identifieringen av målorganen.
 - Karakterisering av förhållandet dos-respons.
 - Identifieringen av nivån där ingen skadlig effekt observeras (NOAEL) eller utgångspunkten för upprättandet av en referensdos (BMD).
 - Förutsägelsen av kroniska toxicitetseffekter på nivåer för mänsklig exponering.
 - Tillhandahållande av data för att testa hypoteser om verkningsätt (6).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

7. Vid bedömningen och utvärderingen av de toxikologiska egenskaperna hos en testkemikalie bör all tillgänglig information om testkemikalien beaktas av testlaboratoriet innan studien genomförs, i syfte att fokusera på utformningen av studien för att mer effektivt testa den kroniska toxicitetspotentialen och minimera användningen av djur. Information som underlättar studiens utformning inkluderar identitet, kemisk struktur, och fysikalisk-kemiska egenskaper hos testkemikalien, eventuell information om verknings sätt, resultat från eventuella in vitro- eller in vivo-toxicitetstester; förväntad användning(ar) och risken för mänsklig exponering, tillgängliga (Q)SAR-data och toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier, tillgängliga toxikokinetiska data (engångsdos- och upprepad dos-kinetik om det finns tillgängligt) och data från andra studier med upprepad exponering. Fastställandet av kronisk toxicitet bör endast utföras efter att inledande information om toxicitet har erhållits från 28-dagars och/eller 90-dagars tester med upprepad dosering. Ett stegvist förhållningssätt till testning av kronisk toxicitet bör betraktas som en del av den övergripande bedömningen av de potentiella hälsoeffekterna för en viss testkemikalie (11) (12) (13) (14).
8. De statistiska metoder som är mest lämpade för analys av resultaten, med tanke på försöksutformningen och målen, bör fastställas innan studien påbörjas. Frågor att överväga kan inbegripa huruvida statistiken ska omfatta justeringar för överlevnad och analys i händelse av förtida avlivning av en eller flera grupper. Vägledning om lämpliga statistiska analyser och viktiga referenser till internationellt erkända statistiska metoder ges i vägledningsdokument nr 116 (6), samt i vägledningsdokument nr 35 om analys och utvärdering av studier över kronisk toxicitet och karcinogenicitet (15).
9. Vid genomförandet av en studie om kronisk toxicitet bör man alltid följa de vägledande principer och överväganden som beskrivs i OECD:s vägledningsdokument nr 19 om erkännande, bedömning och användning av kliniska tecken som humana endpoints för försöksdjur som används i säkerhetsbedömningen (16). Se särskilt punkt 62. Detta avsnitt anger att "I studier med upprepad dosering när ett djur visar kliniska tecken som är progressiva, vilket leder till ytterligare försämring av tillståndet, bör ett välgrundat beslut tas om man ska eller inte ska avliva djuret av humanitära skäl. Beslutet bör även omfatta övervägandet av värdet av informationen som fås genom fortsatt skötsel av det djuret i studien i förhållande till dess övergripande tillstånd. Om ett beslut har tagits att låta djuret kvarstå i testet, bör observationsfrekvensen ökas vid behov. Det är också möjligt, utan att allvarligt påverka syftet med testet, att tillfälligt upphöra med doseringen om det kan minska smärtan eller lidandet, eller att minska testdosen."
10. Detaljerad vägledning om och diskussion om principerna för valet av dos för studier om kronisk toxicitet och karcinogenicitet finns i vägledningsdokument nr 116 (6) samt i två internationella publikationer från Life Sciences Institute (17) (18). Den centrala strategin för valet av dos är beroende av det primära målet eller målen med studien (punkt 6). Vid val av lämpliga dosnivåer bör en balans uppstå mellan farundersökning å ena sidan och karakterisering av lågdosresponser och deras betydelse på den andra. Detta är särskilt relevant i en situation där en kombinerad studie av kronisk toxicitet och karcinogenicitet (kapitel B.33 i denna bilaga) genomförs (punkt 11).
11. Man bör överväga att genomföra en kombinerad studie av kronisk toxicitet och karcinogenicitet (kapitel B.33 i denna bilaga), snarare än ett separat utförande av en studie av kronisk toxicitet (denna testmetod B.30) och en studie av karcinogenicitet (kapitel B.32 i denna bilaga). Det kombinerade testet ger större effektivitet vad gäller tid och kostnad jämfört med att jämföra två separata studier, utan att man kompromissar med datans kvalitet i antingen den kroniska eller karcinogena fasen. Noggrant övervägande bör dock ges för principerna av valet av dos (punkterna 9 och 20–25) vid en kombinerad studie av kronisk toxicitet och karcinogenicitet (kapitel B.33 i denna bilaga), och det är också erkänt att separata studier kan krävas under vissa regelverk.
12. Definitioner som används inom ramen för den här metoden finns i slutet av det här kapitlet och i vägledningsdokumentet nr 116 (6).

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

13. Testkemikalien administreras dagligen i graderade doser till flera grupper försöksdjur, i allmänhet under en 12-månadersperiod, även om kortare eller längre varaktigheter kan väljas beroende på myndighetskrav (se punkt 33). Denna längd är vald för att vara tillräckligt lång för att eventuella effekter av kumulativ toxicitet blir uppenbara, utan de störande effekterna av geriatriska förändringar. Avvikelse från exponeringstider på 12 månader bör motiveras, särskilt när det gäller kortare varaktigheter. Testkemikalien administreras normalt oralt även om inhalation eller via huden också kan vara lämpligt. Studiens utformning kan även omfatta en eller flera avlivningar t.ex. vid 3 eller 6 månader, och ytterligare djur kan inkluderas för att tillgodose detta (se punkt 19). Under administreringsperioden observeras djuren noggrant efter tecken på toxicitet. Djur som dör eller avlivas under testet obduceras, och i slutet av testet avlivs överlevande djur och obduceras.

METODBESKRIVNING

Val av djurart

- Den här testmetoden täcker främst bedömning och utvärdering av kronisk toxicitet hos gnagare (se punkt 2) även om liknande studier av icke-gnagare kan krävas under vissa regelverk. Valet av art bör motiveras. Utformning och genomförande av studier av kronisk toxicitet i icke-gnagare, när så krävs, bör baseras på de principer som beskrivs i denna testmetod tillsammans med dem i kapitel B.27 i denna bilaga, 90-dagars oral toxicitetsstudie på icke-gnagare (5). Ytterligare information om val av arter och stam ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 (6).
- I den här testmetoden används råttor, även om andra gnagare t.ex. mus kan användas. Råttor och möss har föredragits på grund av deras relativt korta livslängd, deras breda användning i farmakologiska och toxikologiska studier, deras känslighet för tumörinduktion och tillgången på stammar som beskrivits tillräckligt ingående. Som en följd av dessa egenskaper finns en stor mängd information tillgänglig om deras fysiologi och patologi. I testet bör unga friska vuxna djur användas av stammar som vanligtvis används på laboratorier. Studien av kronisk toxicitet måste utföras med djur från samma stam och ursprung som de som användes i den inledande studien(rna) av toxicitet med kortare varaktighet. Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

- Djuren kan inhysas individuellt, eller i små grupper av samma kön; individuell inhysning ska endast övervägas om det är vetenskapligt motiverat (19) (20) (21). Burarna bör placeras så att en möjlig påverkan beroende på deras placering minimeras. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 °C (\pm 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och helst inte överstiga 70 % utom när rummet rengörs, och målet bör vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell, med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas med ett obegränsat utbud av dricksvatten. Kosten ska uppfylla alla näringsmässiga krav för arterna som testas och innehållet av föroreningar i kosten som kan påverka testresultatet inkluderar, men är ej begränsade till, bekämpningsmedelsrester, långlivade organiska föroreningar, fytoöstrogener, tungmetaller och mykotoxiner, och bör vara så låga som möjligt. Analytisk information om närings- och kostföroreningsnivåer bör genereras periodiskt, åtminstone i början av studien och när det finns en förändring i det använda partiet, och bör ingå i den slutliga rapporten. Analytisk information om dricksvattnet som används i studien ska likaledes ingå. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie och för att tillgodose djurens näringsbehov när testkemikalien tillförs genom kosten.

Förberedelse av djuren

- Friska djur, som har aklimatiserat sig till laboratoriets betingelser i minst 7 dagar och inte tidigare har ingått i försök, ska användas. När det gäller gnagare bör doseringen av djuren påbörjas snarast möjligt efter avvänjning och aklimatisering, och helst innan djuren är 8 veckor gamla. Försöksdjuren bör karakteriseras efter art, stam, ursprung, kön, vikt och ålder. Vid undersökningens början bör viktvariationen hos varje kön vara minimal och inte överstiga \pm 20 % av medelvikten för alla djur inom studien, separat för varje kön. Djuren fördelas slumpvis i kontroll- och behandlingsgrupperna. Efter randomiseringen bör det inte finnas några signifikanta skillnader i genomsnittliga kroppsvikter mellan grupper inom varje kön. Om det finns statistiskt signifikanta skillnader, bör randomiseringssteget upprepas, om möjligt. Varje djur bör tilldelas ett unikt identifikationsnummer, och märkas permanent med detta nummer genom tatuering, mikrochipimplantat, eller med annan lämplig metod.

PROCEDUR

Djurens antal och kön

- Bägge könen ska användas. Ett tillräckligt antal djur ska användas, så att det i slutet av studien finns tillräckligt många djur i varje grupp för en grundlig biologisk och statistisk utvärdering. För gnagare ska minst 20 djur per kön och grupp normalt användas vid varje dosnivå, medan det för icke-gnagare rekommenderas ett minsta antal av 4 per kön och grupp. I studier där möss ingår behövs fler djur i varje dosgrupp för att genomföra alla nödvändiga hematologiska bestämningar.

Avsättningar för avlivningar, satellitgrupper och kontrolldjur

- Studien får föreskriva avlivningar (minst 10 djur/kön/grupp) t.ex. efter 6 månader för information om utvecklingen av toxikologiska förändringar och mekanistisk information, om det är vetenskapligt motiverat. Om sådan information om testkemikalien redan finns tillgänglig från tidigare toxicitetsstudier med upprepad dosering kanske inte avlivningar är vetenskapligt motiverade. Satellitgrupper kan också ingå för övervakning av reversibiliteten av eventuella toxikologiska förändringar som orsakats av den testkemikalie som undersöks, dessa begränsas normalt till studiens högsta dosnivå plus kontroll. Ytterligare en grupp kontrolldjur (normalt 5 djur per kön) kan också ingå för övervakning av sjukdomsstatus under studien (22), om nödvändigt. Om

avlivning eller införlivande av satellit- eller kontrollgrupper planeras, ska antalet djur som ingår i studien ökas med det antal djur som ska avlivas innan studien slutförts. Dessa djur bör normalt genomgå samma observationer, inklusive kroppsvikt, foder-/vattenkonsumtion, hematologiska och kliniska biokemiska mätningar och patologiska undersökningar, som djuren i den kroniska toxicitetsfasen i huvudstudien, även om avsättningar också kan göras (i avlivningsgruppen) för att mätningarna ska begränsas till vissa viktiga mätningar såsom neurotoxicitet eller immunotoxicitet.

Dosgrupper och dosering

20. Vägledning över alla aspekter av valet av dos och dosnivå finns i vägledningsdokument nr 116 (6). Minst tre dosnivåer och en parallell kontroll ska användas, utom om ett toleranstest utförs (se punkt 27). Dosnivåer grundas i allmänhet på resultaten från en korttidsstudie med upprepad dosering eller en spännviddsstudie och bör beakta eventuella toxikokinetiska data som finns tillgängliga om testkemikalien eller närbesläktade kemikalier.
21. Såvida den inte är begränsad genom testkemikalien fysikalisk-kemiska natur eller biologiska verkningar, bör den högsta dosnivån normalt väljas för att identifiera de viktigaste målorganen och de toxiska effekterna samtidigt som man undviker lidande, svår toxicitet, sjuklighet eller död. Samtidigt som man tar hänsyn till de faktorer som anges nedan i punkt 22, ska den högsta dosnivån väljas för att framkalla tecken på toxicitet, vilket framgår av till exempel en sänkning av kroppsviktundersökningen (ca 10 %).
22. Dock kan man beroende på målen för studien (se punkt 6), välja en toppdos lägre än den dos som ger tecken på toxicitet, t.ex. om en dos framkallar en negativ effekt som har liten eller ingen påverkan på livslängd eller kroppsvikt. Den övre dosen bör inte överskrida 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag (gränsdos, se punkt 27).
23. Dosnivåer och dosnivåspridning kan väljas för att etablera en dosrespons och en NOAEL eller andra avsedda resultat av studien, t.ex. en BMD (se punkt 25) för den lägsta dosnivån. Faktorer som bör beaktas i placeringen av lägre doser inkluderar den förväntade lutningen för dosrespons-kurvan, de doser vid vilka viktiga förändringar kan uppstå i metabolismen eller den toxiska verkningens art, där ett tröskelvärde förväntas eller där en utgångspunkt för lågdosextrapolering förväntas.
24. Den dosnivåspridning som väljs beror på testkemikalien egenskaper och kan inte föreskrivas i denna testmetod, men två- till fyrfaldiga dosintervall ger ofta bra testprestanda för att fastställa fallande dosnivåer, och tillägg av en fjärde testgrupp är att föredra framför användningen av mycket stora intervall (t.ex. en faktor på mer än ca 6–10) mellan doseringarna. I allmänhet bör användningen av faktorer som är större än 10 undvikas och motiveras om de används.
25. Som beskrivs vidare i vägledningsdokument nr 116 (6), inkluderar punkter som ska beaktas vid val av dos:
 - Kända eller misstänkta olinjäriteter eller inflexionspunkter i dosresponsen.
 - Toxikokinetik och dosintervall där metabolisk induktion, mättnad eller olinjäritet mellan externa och interna doser uppträder eller ej.
 - Utgångsskador, markörer för verkan eller indikatorer för viktiga underliggande biologiska processer.
 - Nyckelaspekter (eller misstänkta sådana) för verkningsmekanismer, såsom doser vid vilka cytotoxicitet börjar uppstå, hormonnivåerna störs, homeostatiska mekanismer är överväldigande etc.
 - Områden i dosrespons-kurvan där en särskilt stabil uppskattning behövs, t.ex. intervallet för förväntad BMD eller ett misstänkt tröskelvärde.
 - Beaktande av förväntade exponeringsnivåer för människor.
26. Kontrollgruppen ska vara en obehandlad grupp eller en vehikelkontrollgrupp, om en vehikel används för tillförsel av testkemikalien. Med undantag av behandlingen med testkemikalien, bör djuren i kontrollgruppen hanteras på exakt samma sätt som de i testgrupperna. Om en vehikel används ska kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används bland dosgrupperna. Om en testkemikalie tillförs via kosten och förorsakar ett betydligt minskat intag på grund av mindre välsmakande kost, kan ytterligare en parutfodrad kontrollgrupp vara användbar för en lämpligare kontroll.

27. Om det kan förväntas, baserat på information från inledande studier, att ett test med en dosnivå motsvarande minst 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag med hjälp av de förfaranden som beskrivs här inte ger några skadliga effekter, och om toxicitet inte förväntas baserat på data från strukturellt besläktade kemikalier, anses en fullständig studie med tre dosnivåer inte vara nödvändig. En gräns på 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag kan tillämpas, utom när mänsklig exponering anger att en högre dosnivå ska användas.

Beredning av doser och administrering av testkemikalie

28. Testkemikalien tillförs vanligtvis oralt, via kosten eller dricksvattnet, eller genom sondmatning. Ytterligare information om vägar och metoder för administrering ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 (6). Vägen och metoden för administrering beror på syftet med studien, de fysikalisk/kemiska egenskaperna hos testkemikalien, dess biotillgänglighet och dominerande väg och metod för exponering av människor. En motivering bör ges för vald väg och metod för administrering. Med tanke på djurskydd bör oral sondmatning normalt väljas endast för de ämnen för vilka denna väg och metod för administrering representerar en potentiell mänsklig exponering (t.ex. läkemedel). För kost- eller miljökemikalier inklusive bekämpningsmedel, sker administrering vanligtvis via foder eller dricksvatten. För några situationer, t.ex. arbetsrelaterad exponering, kan administrering via andra vägar vara lämpligare.
29. Vid behov kan testkemikalien upplösas eller suspenderas i en lämplig vehikel. Hänsyn bör tas till följande egenskaper hos vehikeln och andra tillsatser, i förekommande fall: Verkningsmekanismar på absorption, distribution, metabolism eller retention av testkemikalien, verkningsmekanismar på testkemikalien kemiska egenskaper som kan förändra dess toxiska egenskaper samt påverkan på foder- eller vattenkonsumtion, eller djurens nutritionsstatus. Det rekommenderas, när så är möjligt, att man först använder en vattenbaserad lösning/suspension följt av en lösning/emulsion i olja (t.ex. majsolja) och därefter eventuell lösning i andra vehiklar. För andra vehiklar än vatten bör de toxiska egenskaperna hos vehikeln vara kända. Information om testkemikalien stabilitet och doseringslösningarnas eller fodrets homogenitet (i förekommande fall) enligt villkoren för administrering (t.ex. kost), bör finnas tillgängliga.
30. För kemikalier som tillförs via foder eller dricksvatten är det viktigt att säkerställa att kvantiteterna av den berörda testkemikalien inte påverkar normal närings- eller vattenbalans. I långtidsstudier med kostadministrering bör koncentrationen av testkemikalien i fodret normalt inte överskrida en övre gräns på 5 % av den totala kosten, för att undvika näringsmässig obalans. När testkemikalien tillförs via kosten, kan antingen en konstant foderkoncentration (mg/kg foder eller ppm) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt (mg/kg kroppsvikt), beräknad på veckobasis, användas. Det alternativ som används ska anges.
31. Vad gäller oral administrering doseras djuren med testkemikalien dagligen (sju dagar i veckan), vanligtvis under en period på 12 månader (se också punkt 33), även om en längre varaktighet kan krävas beroende på myndighetskrav. Alla andra doseringsscheman, t.ex. fem dagar per vecka, måste motiveras. När det gäller dermal administrering, behandlas djuren normalt med testkemikalien minst 6 timmar per dag, 7 dagar per vecka, enligt kapitel B.9 i denna bilaga (10), under en period av 12 månader. Exponering genom inhalation utförs 6 timmar per dag, 7 dagar per vecka, men exponering 5 dagar per vecka kan också användas om detta är motiverat. Exponeringsperioden är normalt en period på 12 månader. Om andra gnagare än råttor utsätts för enbart nos, kan de maximala exponeringstiderna justeras för att minska artspecifikt lidande. En motivering bör ges när man använder en exponeringstid kortare än 6 timmar per dag. Se också kapitel B.8 i denna bilaga (8).
32. När en testkemikalie administreras via sondmatning bör detta ske via en magsond eller en lämplig intubationskanyl vid ungefär samma tid varje dag. Normalt administreras en singeldos en gång per dag, men om en kemikalie är lokalt irriterande är det möjligt att upprätthålla den dagliga dosen genom delad dos (två gånger per dag). Den största mängd vätska som kan administreras vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör vara så liten som möjligt, och bör normalt inte överstiga 1 ml/100 g kroppsvikt för gnagare (22). Variationer i testvolym bör minimeras genom justering av koncentrationen för att säkerställa en konstant volym vid alla dosnivåer. Potentiellt frätande eller irriterande kemikalier är undantagna, och måste spädas ut för att allvarliga lokala verkningsmekanismer ska kunna undvikas. Testning vid koncentrationer som sannolikt är frätande eller irriterande för magtarmkanalen bör undvikas.

Studiens varaktighet

33. Även om den här testmetoden främst är utformad som en 12-månaders kronisk toxicitetsstudie kan den tillämpas på antingen kortare (t.ex. 6 eller 9 månader) eller längre (t.ex. 18 eller 24 månader) varaktighetsstudier, beroende på kraven för särskilda regelverk eller särskilda mekanistiska ändamål. Avvikelse från en exponeringstid på 12 månader bör motiveras, särskilt när det gäller kortare varaktigheter. Satellitgrupper som ingår för att övervaka reversibiliteten av eventuella toxikologiska förändringar som orsakats av den testkemikalie som undersöks, ska bibehållas utan dosering under en period som inte är kortare än 4 veckor och inte längre än en tredjedel av den totala studieperioden efter avslutad exponering. Ytterligare vägledning, inklusive en bedömning av överlevnaden i studien finns i vägledningsdokument nr 116 (6).

IAKTTAGELSER

34. Samtliga djur bör observeras beträffande sjuklighet eller mortalitet, vanligtvis i början och slutet av varje dag, inklusive helger och helgdagar. Allmänna kliniska observationer bör göras minst en gång per dag, helst vid samma tidpunkt(er), och ta hänsyn till maximalt förväntade effekter efter doseringen när det gäller administrering via sondmatning.
35. Detaljerade kliniska observationer bör göras på samtliga djur minst en gång före den första exponeringen (för jämförelser inom samma objekt), i slutet av studiens första vecka och därefter varje månad. Observationsprotokollet bör anordnas så att variationerna mellan enskilda observatörer minimeras och är oberoende av testgrupp. Dessa observationer bör göras utanför buren på avsedd plats, ungefär vid samma tidpunkter varje gång. De bör noggrant registreras, helst med hjälp av ett poängsystem som utförligt definierats av testlaboratoriet. Ansträngningar bör göras för att säkerställa att variationer i observationsbetingelserna är minimala. Observationerna bör omfatta, men inte begränsas till, förändringar av hud, päls, ögon, slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (t.ex. tårflöde, upprest hårrem, pupillstorlek och ovanligt andningsmönster). Förändringar i gång, hållning och reaktion på hantering liksom eventuella kramper eller spasmer, stereotypier (t.ex. överdrivet putsande, repetitivt cirklande) eller bisarrt beteende (t.ex. självstypning, baklängsgång) bör också registreras (24).
36. En oftalmologisk undersökning med ett oftalmoskop eller annan lämplig utrustning bör utföras på samtliga djur före den första administreringen av testkemikalien. Vid slutet av studien bör denna undersökning helst utföras på samtliga djur, men åtminstone på högdos- och kontrollgrupperna. Om behandlingsrelaterade ögonförändringar upptäcks bör samtliga djur undersökas. Om strukturell analys eller annan information tyder på okulär toxicitet bör frekvensen på okulära undersökningar höjas.
37. För kemikalier där tidigare 28-dagars och/eller 90-dagars toxicitetstest med upprepad dosering indikerade en potential för att framkalla neurotoxiska effekter, bör sensorisk reaktion på stimuli av olika slag (24) (t.ex. hörsel, syn och djupsensorisk stimuli) (25), (26), (27), bedömning av greppstyrka (28) och bedömning av motorisk aktivitet (29) eventuellt utföras före studiestarten och vid 3-månadersperioder efter studiestarten till och med 12 månader, samt vid studiens upphörande (om längre än 12 månader). Ytterligare uppgifter om de procedurer som kan följas finns i respektive hänvisningar. Dock kan andra procedurer än de som hänvisats till också användas.
38. För kemikalier där tidigare 28-dagars och/eller 90-dagars toxicitetstester med upprepad dosering indikerade en potential för att orsaka immunologiska effekter, kan ytterligare undersökningar av denna endpoint eventuell utföras vid avslutningen.

Kroppsvikt, foder-/vattenkonsumtion och fodereffektivitet

39. Samtliga djur bör vägas vid behandlingens början, minst en gång i veckan de första 13 veckorna och därefter minst en gång per månad. Mätningar av foderkonsumtion och fodereffektivitet bör minst göras varje vecka de 13 första veckorna och därefter minst en gång per månad. Vattenkonsumtionen bör mätas minst en gång per vecka de 13 första veckorna, och därefter minst varje månad, när kemikalien administreras via dricksvattnet. Mätningar av vattenkonsumtionen bör också övervägas för studier där vattendrickandet förändras.

Hematologi och klinisk biokemi

40. I studier med gnagare bör hematologiska undersökningar utföras på minst 10 handjur och 10 hondjur per grupp, vid 3, 6 och 12 månader, samt vid studiens slut (om längre än 12 månader), på samma djur hela tiden. Satellitdjur kan behövas när det gäller möss för att genomföra alla nödvändiga hematologiska bestämningar (se punkt 18). För icke-gnagare måste prover tas från ett mindre antal djur (t.ex. 4 djur per kön och per grupp för hundstudier) vid mellanliggande provtagningsstillfällen och avslutandet enligt vad som beskrivits för gnagare. Mätningar vid 3 månader, antingen på gnagare eller icke-gnagare, behöver inte utföras om inga effekter syntes på hematologiska parametrar i en tidigare 90-dagars studie som genomfördes med jämförbara dosnivåer. Blodprover bör tas under narkos från angivet ställe, till exempel genom hjärtpunktering eller från retro-orbitalsinus.
41. Följande lista över parametrar bör undersökas (30): total- och differentialräkning av vita blodkroppar, erytrocyttantal, trombocytantal, hemoglobinkoncentration, hematokrit (packad cellvolym), medelvärde för korpuskulärvolym (MCV), medelvärde för korpuskulärt hemoglobin (MCH), medelvärde för korpuskulär hemoglobinkoncentration (MCHC), protrombintid och aktiverad partiell tromboplastintid. Övriga hematologiska parametrar såsom Heinz-kroppar eller annan atypisk erythrocytmorfologi eller methemoglobin kan mätas på lämpligt sätt beroende på testkemikalies toxicitet. Sammantaget bör en flexibel strategi antas, beroende på den observerade och/eller förväntade verkningen av en given testkemikalie. Om testkemikalien har en effekt på det hematopoetiska systemet, kan retikulocytantal och benmärgscytologi också anges, men detta behöver inte utföras rutinmässigt.

42. Kliniska biokemiska bestämningar för att undersöka större toxiska effekter i vävnader och, särskilt, effekter på lever och njurar bör utföras på blodprov från minst 10 handjur och 10 hondjur per grupp, vid samma tidsintervall som specificerades för den hematologiska undersökningen, med samma djur hela tiden. Satellitdjur kan behövas när det gäller möss för att genomföra alla nödvändiga kliniska biokemiska bestämningar. För icke-gnagare måste prover tas från ett mindre antal djur (t.ex. 4 djur per kön och per grupp för hundstudier) vid mellanliggande provtagningsstillfällen och avslutandet enligt vad som beskrivits för gnagare. Mätningar vid 3 månader, antingen på gnagare eller icke-gnagare, behöver inte utföras om inga effekter syntes på kliniska biokemiska parametrar i en tidigare 90-dagars studie som genomfördes med jämförbara dosnivåer. Det rekommenderas att djuren fastar över natten (med undantag av möss) före blodprovstagningen. Följande lista över parametrar bör undersökas (30): glukos, urea (ureakväve), kreatinin, totalprotein, albumin, kalcium, natrium, kalium, totalkolesterol, minst två lämpliga tester för hepatocellular utvärdering (alaninaminotransferas, aspartataminotransferas, glutamatdehydrogenas, totala gallsyror) (31), och minst två lämpliga tester för hepatobiliär utvärdering (alkaliskt fosfat, gammaglutamyl transferas, 5'-nukleotidas, totalt bilirubin, totala gallsyror) (31). Andra kliniska kemiska parametrar såsom triglycerider vid fasta, specifika hormoner och kolinesteras kan mätas på lämpligt sätt, beroende på testkemikalens toxicitet. Sammantaget finns det ett behov av en flexibel strategi, beroende på den observerade och/eller förväntade verkningen av en given testkemikalie.
43. Urinanalyserna bör utföras på minst 10 handjur och 10 hondjur per grupp, på prov som tagits vid samma intervaller som för hematologi och klinisk kemi. Mätningar vid 3 månader behöver inte utföras om ingen effekt syntes på urinanalysen i en tidigare 90-dagars studie som genomfördes med jämförbara dosnivåer. Följande lista över parametrar ingick i en sakkunnig rekommendation om kliniska patologiska studier (30): utseende, volym, osmolalitet eller specifik vikt, pH, totalprotein och glukos. Andra bestämningar inkluderar keton, urobilinogen, bilirubin och ockult blödning. Ytterligare parametrar kan användas vid behov för att utvidga undersökningen av observerad(e) verkning(ar).
44. Det anses allmänt att utgångsvärden för hematologiska och kliniska kemiska variabler behövs före behandlingen i hundstudier, men inte behöver bestämmas för studier i gnagare (30). Om historiska basdata (se punkt 50) är otillräckliga bör man överväga att generera sådana data.

Patologi

Obduktion

45. Samtliga djur i studien bör normalt underkastas en fullständig obduktion, som omfattar omsorgsfull granskning av kroppens yttre ytor, alla kroppsöppningar samt kranium, bröst- och bukhåla och deras innehåll. En bestämelse kan också göras (i avlivnings- eller satellitgrupperna) så att mätningarna begränsas till vissa viktiga åtgärder, såsom neurotoxicitet eller immunotoxicitet (se punkt 19). Dessa djur behöver inte obduceras och efterföljande procedurer beskrivs i nedanstående punkter. Obduktion kan från fall till fall krävas av indikator-djur, efter beslut av försöksledaren.
46. Organvikter bör samlas från samtliga djur, förutom de som undantas genom den senare delen av punkt 45. Binjuror, hjärna, bitestiklar, hjärta, njurar, lever, äggstockar, mjälte, testiklar, sköldkörtel (vägda efter fixering, med bisköldkörtlar) och livmoder från samtliga djur (bortsett från de döende och/eller avlivade) putsas från angränsande vävnad, i förekommande fall, och deras våtvikt bestäms så snart som möjligt efter dissektionen för att undvika uttorkning. I studier med möss är det valfritt med vägning av binjurarna.
47. Följande vävnader bör bevaras i det mest lämpade fixeringsmedlet för både vävnadstypen och den planerade efterföljande histopatologiska undersökningen (32) (vävnader inom hakparenteser är valfria):

alla större skador	hjärta	pankreas	mage (förmagen, glandulärmagen)
binjure	ileum	bisköldkörtel	[tänder]
aorta	jejunum	perifer nerv	testikel
hjärna (inklusive delar av cerebrum, cerebellum och medulla/pons)	njure	hypofys	tymus
cekum	tårkörtel (exorbital)	prostata	sköldkörtel
cervix	lever	rektum	[tunga]

koagulerande körtel	lunga	spottkörtel	trakea
kolon	lymfkörtlar (både ytliga och djupa)	sädesblåsa	urinblåsa
tolvfingerarm	bröstkörtel (obligatorisk för honor, och om synlig och dissekeringsbar hos hanar)	skelettmuskel	uterus (inklusive cervix)
bitestikel	[övre luftvägarna, inklusive nos, turbinates och bihålorna]	hud	[ureter]
öga (inklusive näthinna)	esofagus	ryggmärg (på tre nivåer: cervikal, mitt på bröstkorgen och ländryggen)	[uretra]
[lårben med led]	[luktblub]	mjälte	vagina
gallblåsa (för andra arter än rätta)	äggstock	[bröstben],	snitt av ryggmärgen och/eller ett färskt benmärgs-aspirat
Harderiankörtel			

När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen bevaras. Kliniska och andra fynd kan indikera behovet av att undersöka ytterligare vävnader. Också alla organ som sannolikt är målorgan, baserat på kunskap om testkemikalens egenskaper, ska konserveras. I studier som inbegriper administrering via huden bör organen som anges för oralt intag bevaras, och det är viktigt med särskild provtagning och bevarande av huden där appliceringen har skett. I inhalationsstudier bör förteckningen över bevarade och undersökta vävnader från luftvägarna följa rekommendationerna i kapitel B.8 (8) och kapitel B.29 i denna bilaga (9). För andra organ/vävnader (och i tillägg till de specifikt bevarade vävnaderna från luftvägarna) bör de organ som finns i förteckningen som anges för den orala vägen undersökas.

Histopatologi

48. Vägledning finns tillgänglig om bästa praxis vid genomförande av studier gällande toxikologisk patologi (32). Den minsta histopatologiska undersökningen bör vara:

- Alla vävnader från högdos- och kontrollgrupperna.
- Alla vävnader från djur som dör eller avlivs under studien.
- Alla vävnader som uppvisar makroskopiska abnormaliteter.
- Målvävnader, eller vävnader som uppvisade behandlingsrelaterade förändringar i högdosgruppen, från samtliga djur i alla andra doseringsgrupper.
- När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen undersökas.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

49. Individuella data för samtliga utvärderade parametrar bör ges. Därutöver bör alla data sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antal djur vid testets början, antal djur som påfanns döda under testet eller som avlivats av humanitära skäl och tidpunkten för dödsfallen eller avlivningen, antal djur som visar tecken på toxicitet, en beskrivning av de tecken på toxicitet som observerats, inklusive tidpunkt för de första tecknen, varaktighet och hur allvarliga de toxiska verkningarna är, antal djur som uppvisar skador, typ av skador och procentandelen djur för varje typ av skada. Sammanfattande tabeller bör ge medelvärden och standardavvikelser (för kontinuerliga testdata) för djur som uppvisar toxiska effekter eller skador, i tillägg till skadornas gradering.

50. Historiska kontrolldata kan vara värdefulla vid tolkningen av studiens resultat, t.ex. i de fall då det finns indikationer på att de data som lämnats från de parallella kontrollerna i huvudsak avviker jämfört med aktuell data från kontrolldjuren från samma testanläggning/-koloni. Historiska kontrolldata, om de har utvärderats, bör lämnas in från samma laboratorium och relatera till djur i samma ålder och av samma stam som genererats under de fem år som föregick studien i fråga.
51. När det är tillämpligt bör numeriska resultat utvärderas genom en lämplig och allmänt vedertagen statistisk metod. De statistiska metoderna och datan som ska analyseras bör väljas vid utformningen av studien (punkt 8). Valet bör innehålla bestämmelser om överlevnadsjusteringar, där så krävs.

Testrapport

52. Testrapporten ska omfatta följande information:

Testkemikalie:

- Fysikalisk natur, renhet och fysikalisk-kemiska egenskaper.
- Identifikationsuppgifter.
- Kemikalies källa.
- Satsnummer.
- Intyg om kemisk analys.

Vehikel (i förekommande fall):

- Motivering för val av vehikel (om annan än vatten).

Försöksdjur:

- Art/stam som används och motivering av valet.
- Djurens antal, ålder och kön vid testets början.
- Ursprung, inhysning, kost etc.
- Djurens individuella vikt vid testets början.

Försöksbetingelser:

- Grund för administreringssätt och dosval.
- I förekommande fall, de statistiska metoderna som använts för att analysera datan.
- Uppgifter om testkemikalies sammansättning/foderberedning.
- Analysdata om beredningens uppnådda koncentration, stabilitet och homogenitet.
- Administreringssätt och uppgifter om testkemikalies administrering.
- Om enbart nos eller helkropp vid inhalationsstudier.
- Faktiska doser (mg/kg kroppsvikt/dag) och omräkningsfaktor för kostens/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (mg/kg eller ppm) till den faktiska dosen, om tillämpligt.
- Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

Resultat (sammanfattande data i tabellform och enskilda djurdata ska presenteras):

- Överlevnadsdata.
- Kroppsvikt/kroppsviktsförändringar.
- Foderförbrukning, beräkningar av fodereffektivitet, om det har utförts, och vattenförbrukning, om tillämpligt.
- Uppgifter om toxiska reaktioner efter kön och dosnivå, inklusive tecken på toxicitet.
- Art, förekomst (och, om protokoll förts, allvarlighetsgrad) och de kliniska observationernas varaktighet (om övergående eller permanenta).
- Oftalmologiska undersökningar.
- Hematologiska tester.
- Kliniska biokemiska undersökningar.
- Urinanalyser.
- Resultaten från eventuella undersökningar av neurotoxicitet eller immunotoxicitet.
- Terminal kroppsvikt.
- Organvikter (och deras kvoter, om tillämpligt).
- Obduktionsfynd.
- En detaljerad beskrivning av samtliga behandlingsrelaterade histopatologiska fynd.
- Absorptionsdata, i förekommande fall.

Statistisk bearbetning av resultaten, när så är lämpligt

Diskussion av resultaten, inklusive:

- Dos: respons samband
- Beaktande av eventuell information om verkningsätt.
- Diskussion om eventuella modellstrategier.
- BMD-, NOAEL- eller LOAEL-bestämning.
- Historiska kontrolldata.
- Relevans för människor.

Slutsatser

LITTERATUR

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

- (3) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food. Chem. Toxicol.* 40, 145–191.
- (4) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206: 437–445.
- (5) Kapitel B.27 i denna bilaga, test avseende subkronisk oral toxicitet (90-dagars upprepat oraltest på icke-gnagare).
- (6) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.
- (7) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment N°39, ENV/JM/MONO (2009) 28, OECD, Paris.
- (8) Kapitel B.8 i denna bilaga, subakut inhalationstoxicitet: 28-dagars studie.
- (9) Kapitel B.29 i denna bilaga, subkronisk inhalationstoxicitet: 90-dagars studie.
- (10) Kapitel B.9 i denna bilaga, toxicitet vid upprepad dosering (28 dagar, dermalt).
- (11) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 1–7.
- (12) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9–35.
- (13) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 37–68.
- (14) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 69–98.
- (15) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
- (16) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (17) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit. Rev. Toxicol.* 37 (9): 729–837.
- (18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (19) Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål (EUT L 276, 20.10.2010, s. 33).
- (20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.
- (21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

-
- (22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (23) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* 21:15–23.
- (24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (25) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999–1003.
- (26) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health* 9: 691–704.
- (27) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267–283.
- (28) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233–236.
- (29) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599–609.
- (30) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198–201.
- (31) EMEA (draft) document 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity' (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).
- (32) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126–131.
-

Tillägg 1

DEFINITION

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.”

(6) Kapiteln B.32 och B.33 ska ersättas med följande:

”B.32 KARCINOGENICITETSSTUDIER

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 451 (2009). Den ursprungliga TG 451 om karcinogenicitetsstudier antogs 1981. Utvecklingen av denna reviderade testmetod B.32 ansågs nödvändig för att återspegla den senaste utvecklingen inom djurskydd och myndighetskrav (2) (3) (4) (5) (6). Uppdateringen av denna testmetod B.32 har genomförts parallellt med revideringen av kapitel B.30 i denna bilaga, kroniska toxicitetsstudier, och kapitel B.33 i denna bilaga, kombinerad kronisk toxicitet/karcinogenicitetsstudie i syfte att erhålla ytterligare information om djuren som används i studien och ge ytterligare detaljer om val av dos. Den här testmetoden B.32 är avsedd att användas vid testning av ett brett spektrum av kemikalier, inklusive bekämpningsmedel och industrikemikalier. Det bör påpekas att vissa detaljer och krav kan variera för läkemedel (se internationella konferensen om harmonisering (ICH) vägledning S1B om testning av cancerframkallande läkemedel).
2. Majoriteten av karcinogenicitetsstudier genomförs med gnagare, och den här testmetoden är främst avsedd för studier som genomförs med dessa arter. Skulle sådana studier krävas för icke-gnagare, bör de principer och förfaranden som beskrivs i denna testmetod tillsammans med dem som anges i kapitel B.27 i denna bilaga, 90-dagars toxicitetsstudie med upprepad oral dosering med icke-gnagare (6) tillämpas, med lämpliga modifieringar. Ytterligare vägledning finns i OECD:s vägledningsdokument nr 116 om utformning och genomförande av kroniska toxicitets- och karcinogenicitetsstudier (7).
3. De tre huvudsakliga administreringsätten som används i karcinogenicitetsstudier är oral, dermal och inhalation. Valet av administreringsätt beror på de fysikaliska och kemiska egenskaperna hos testkemikalien och det dominerande exponerings sättet för människor. Ytterligare information om val av exponeringsätt ges i vägledningsdokument nr 116 (7).
4. Den här testmetoden fokuserar på exponering via oralt intag, det intag som används mest i karcinogenicitetsstudier. Även om karcinogenicitetsstudier som medför exponering via huden eller inhalation kan vara nödvändiga för riskbedömning av människors hälsa och/eller kan krävas under vissa regelverk, innebär båda exponeringsvägarna en betydande teknisk komplexitet. Sådana studier måste utformas från fall till fall, även om testmetoden som beskrivs här för bedömningen och utvärderingen av karcinogenicitet skulle kunna utgöra grunden för ett protokoll för inhalations- och/eller hudstudier, med hänsyn tagen till rekommendationer om behandlingsperioder, kliniska eller patologiska parametrar etc. OECD:s vägledning finns tillgänglig om administrering av testkemikalier via huden (7) och genom inhalation (7) (8). Kapitel B.8 i denna bilaga (9) och kapitel B.29 i denna bilaga (10), tillsammans med OECD:s vägledningsdokument om akut inhalationstestning (8), bör särskilt rådfrågas vid utformningen av långsiktiga studier som inbegriper exponering via inhalation. Kapitel B.9 i denna bilaga (11) bör rådfrågas när det gäller testning som utförs via huden.
5. Studien om karcinogenicitet ger information om möjliga hälsofaror som sannolikt kan uppstå vid upprepad exponering under en period som varar upp till hela livslängden för de arter som används. Studien kommer att ge information om de toxiska effekterna hos testkemikalien inklusive potentiell karcinogenicitet, samt indikation om målorgan och möjlig ackumulering. Den kan ge en uppskattning av den icke-observerade nivån för skadliga biverkningar och, i fallet med icke-genotoxiska karcinogener, för tumörrespons som kan användas för att fastställa säkerhetskriterier för exponering av människor. Behovet av noggranna kliniska observationer av djuren i syfte att få fram så mycket information som möjligt betonas också.
6. Målen för karcinogenicitetsstudier som omfattas av denna testmetod inkluderar:
 - Identifieringen av de cancerframkallande egenskaperna hos en testkemikalie, vilket leder till en ökad incidens av tumörer, ökad andel av maligna tumörer eller en minskning av tiden till uppkomsten av tumörer, jämfört med parallella kontrollgrupper.
 - Identifieringen av målorgan för karcinogenicitet.
 - Fastställandet av tiden till uppkomst av tumörer.

- Karakterisering av förhållandet tumör-dosrespons.
- Identifieringen av nivån där ingen skadlig effekt observeras (NOAEL) eller utgångspunkten för upprättandet av en referensdos (BMD).
- Framtida konsekvenser av karcinogena effekter vid mänsklig exponering för lågdosnivåer.
- Tillhandahållande av data för att testa hypoteser om verkningsätt (2) (7) (12) (13) (14) (15).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

7. Vid bedömningen och utvärderingen av den potentiella karcinogeniteten hos en testkemikalie bör all tillgänglig information om testkemikalien beaktas av testlaboratoriet innan studien genomförs, i syfte att fokusera på utformningen av studien för att mer effektivt testa den karcinogena potentialen och minimera användningen av djur. Information om, och hänsyn till, verkningsmekanismen hos ett cancerframkallande ämne (2) (7) (12) (13) (14) (15) är särskilt viktig, eftersom den optimala utformningen kan variera beroende på om testkemikalien är en känd eller misstänkt genotoxisk karcinogen. Ytterligare vägledning om beaktande av verkningsätt finns i vägledningsdokument nr 116 (7).
8. Information som underlättar studiens utformning inkluderar identitet, kemisk struktur, och fysikalisk-kemiska egenskaper hos testkemikalien, resultat från eventuella in vitro- eller in vivo-genotoxicitetstester; förväntad(e) användning(ar) och risken för mänsklig exponering, tillgängliga (Q)SAR-data, mutagenitet/genotoxicitet, karcinogenitet och toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier, tillgängliga toxikokinetiska data (engångsdos- och upprepad dos-kinetik om det finns tillgängligt) och data från andra studier med upprepad exponering. Bedömning av kronisk toxicitet bör utföras efter att inledande information om toxicitet har erhållits från 28-dagars och/eller 90-dagars toxicitetstester med upprepad dosering. Kortsiktiga initieringsfrämjande cancertester kan också ge användbar information. Ett stegvist förhållningssätt till testning av karcinogenitet bör betraktas som en del av den övergripande bedömningen av de potentiella hälsoeffekterna för en viss testkemikalie (16) (17) (18) (19).
9. De statistiska metoder som är mest lämpade för analys av resultaten, med tanke på försöksutformningen och målen, bör fastställas innan studien påbörjas. Frågor att överväga inkluderar huruvida statistiken bör innefatta justering av överlevnad, analys av kumulativa tumörrisker i förhållande till överlevnadsvaraktighet, analys av tiden till tumören och analys i händelse av förtida terminering av en eller fler grupper. Vägledning om lämpliga statistiska analyser och viktiga referenser till internationellt erkända statistiska metoder ges i vägledningsdokument nr 116 (7), samt i vägledningsdokument nr 35 om analys och utvärdering av studier över kronisk toxicitet och karcinogenitet (20).
10. Vid genomförandet av en studie om karcinogenitet bör man alltid följa de vägledande principer och överväganden som beskrivs i OECD:s vägledningsdokument nr 19 om erkännande, bedömning och användning av kliniska tecken som humana endpoints för försöksdjur som används i säkerhetsbedömningen (21). Se särskilt punkt 62. Detta avsnitt anger att "I studier med upprepad dosering när ett djur visar kliniska tecken som är progressiva, vilket leder till ytterligare försämring av tillståndet, bör ett välgrundat beslut tas om man ska eller inte ska avliva djuret av humanitära skäl. Beslutet bör även omfatta övervägandet av värdet av informationen som fås genom fortsatt skötsel av det djuret i studien i förhållande till dess övergripande tillstånd. Om ett beslut har tagits att låta djuret kvarstå i testet, bör observationsfrekvensen ökas vid behov. Det är också möjligt, utan att allvarligt påverka syftet med testet, att tillfälligt upphöra med doseringen om det kan minska smärtan eller lidandet, eller att minska testdosen."
11. Detaljerad vägledning om och diskussion av principerna för valet av dos för studier om kronisk toxicitet och karcinogenitet finns i vägledningsdokument nr 116 (7) samt i två internationella publikationer från Life Sciences Institute (22) (23). Den centrala strategin för valet av dos är beroende av det primära målet eller målen med studien (punkt 6). Vid val av lämpliga dosnivåer bör en balans uppstå mellan farundersökning å ena sidan och karakterisering av lågdosrespons och deras betydelse på den andra. Detta är särskilt relevant i en situation där en kombinerad studie av kronisk toxicitet och karcinogenitet (kapitel B.33 i denna bilaga) genomförs (punkt 12).
12. Man bör överväga att genomföra en kombinerad studie av kronisk toxicitet och karcinogenitet (kapitel B.33 i denna bilaga), snarare än ett separat utförande av en studie av kronisk toxicitet (kapitel B.30 i denna bilaga) och en studie av karcinogenitet (denna testmetod B.32). Det kombinerade testet ger större effektivitet vad gäller tid och kostnad jämfört med att jämföra två separata studier, utan att man kompromissar med datans kvalitet i antingen den kroniska eller karcinogena fasen. Noggrant övervägande bör dock ges för principerna av valet av dos (punkterna 11 och 22–25) vid en kombinerad studie av kronisk toxicitet och karcinogenitet (kapitel B.33 i denna bilaga), och det är också erkänt att separata studier kan krävas under vissa regelverk.

13. Definitioner som används inom ramen för den här metoden finns i slutet av det här kapitlet och i vägledningsdokumentet nr 116 (7).

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

14. Testkemikalien administreras dagligen i graderade doser till flera grupper av försöksdjur för huvuddelen av deras livslängd, normalt via oralt intag. Testning genom inhalation eller via huden kan också vara lämpligt. Djuren observeras noggrant avseende tecken på toxicitet och för utvecklingen av neoplastiska skador. Djur som dör eller avlivas under testet obduceras, och i slutet av testet avlivas överlevande djur och obduceras.

BESKRIVNING AV METOD

Val av djurart

15. Den här testmetoden täcker främst bedömning och utvärdering av karcinogenicitet hos gnagare (punkt 2). Användningen av icke-gnagare kan övervägas när tillgängliga data tyder på att de är mer relevanta för förutsägelser av hälsoeffekter på människor. Valet av art bör motiveras. Rekommenderad gnagare är råttor, även om andra gnagare t.ex. mus kan användas. Även om användningen av möss i karcinogenicitetstester kan ha begränsad användbarhet (24) (25) (26), krävs fortfarande karcinogenicitetstester med möss under några aktuella regelverk såvida det inte kan fastställas att en sådan studie inte är vetenskapligt nödvändig. Råttor och möss har föredragits på grund av deras relativt korta livslängd, deras breda användning i farmakologiska och toxikologiska studier, deras känslighet för tumörinduktion och tillgången på stammar som beskrivits tillräckligt ingående. Som en följd av dessa egenskaper finns en stor mängd information tillgänglig om deras fysiologi och patologi. Ytterligare information om val av arter och stam ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 (7).
16. I testet bör unga friska vuxna djur användas av stammar som vanligtvis används på laboratorier. Karcinogenicitetsstudien bör helst utföras på djur från samma stam och ursprung som de som användes i den inledande toxicitetsstudien(erna) med kortare varaktighet, dock, om djur från samma stam och ursprung är kända för att ge problem med att uppnå det normalt accepterade kriteriet för överlevnad i långsiktiga studier (se vägledningsdokument nr 116 (7)), bör man överväga att använda en stam med acceptabel överlevnadsgrad för den långsiktiga studien. Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga.

Inhysning och utfodring

17. Djuren kan inhysas individuellt, eller i små grupper av samma kön; individuell inhysning ska endast övervägas om det är vetenskapligt motiverat (27) (28) (29). Burarna bör placeras så att en möjlig påverkan beroende på deras placering minimeras. Temperaturen i försöksdjurens utrymme bör vara 22 °C (\pm 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och helst inte överstiga 70 % utom när rummet rengörs, och målet bör vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell, med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas med ett obegränsat utbud av dricksvatten. Kosten ska uppfylla alla näringsmässiga krav för arterna som testas och innehållet av föroreningar i kosten som kan påverka testresultatet inkluderar, men är ej begränsade till, bekämpningsmedelsrester, långlivade organiska föroreningar, fitoöstrogener, tungmetaller och mykotoxiner, och bör vara så låga som möjligt. Analytisk information om närings- och kostföroreningsnivåer bör genereras periodiskt, åtminstone i början av studien och när det finns en förändring i det använda partiet, och bör ingå i den slutliga rapporten. Analytisk information om dricksvattnet som används i studien ska likaledes ingå. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie och för att tillgodose djurens näringsbehov när testkemikalien tillförs genom kosten.

Förberedelse av djuren

18. Friska djur, som har aklimatiserat sig till laboratoriets betingelser i minst 7 dagar och inte tidigare har ingått i försök, ska användas. När det gäller gnagare bör doseringen av djuren påbörjas snarast möjligt efter avvänjning och aklimatisering, och helst innan djuren är 8 veckor gamla. Försöksdjuren bör karakteriseras efter art, stam, ursprung, kön, vikt och ålder. Vid undersökningens början bör viktvariationen hos varje kön vara minimal och inte överstiga \pm 20 % av medelvikten för alla djur inom studien, separat för varje kön. Djuren fördelas slumpvis i kontroll- och behandlingsgrupperna. Efter randomiseringen bör det inte finnas några signifikanta skillnader i genomsnittliga kroppsvikter mellan grupper inom varje kön. Om det finns statistiskt signifikanta skillnader, bör randomiseringssteget upprepas, om möjligt. Varje djur bör tilldelas ett unikt identifikationsnummer, och märkas permanent med detta nummer genom tatuering, mikrochipimplantat, eller med annan lämplig metod.

PROCEDUR

Djurens antal och kön

19. Bägge könen ska användas. Ett tillräckligt antal djur ska användas så att en grundlig biologisk och statistisk utvärdering är möjlig. Varje dosgrupp och parallell kontrollgrupp bör därför innehålla minst 50 djur av vardera könet. Beroende på syftet med studien finns det möjlighet att öka den statistiska giltigheten för de viktigaste uppskattningarna genom att fördela djuren ojämnt till de olika dosgrupperna, med t.ex. fler än 50 djur i lågdosgruppen, för att uppskatta den cancerframkallande potentialen vid låga doser. Det ska dock erkännas att en måttlig ökning av gruppstorlek ger en relativt liten ökning av den statistiska giltigheten för studien. Ytterligare information om statistisk utformning av studien och val av dosnivåer för att maximera den statistiska giltigheten finns i vägledningsdokument nr 116 (7).

Avsättningar för avlivningar och satellitgrupper (kontroll)

20. Studien får föreskriva avlivningar t.ex. efter 12 månader för att få information om framskridandet av neoplastiska förändringar och mekanistisk information, om det är vetenskapligt motiverat. Om sådan information om testkemikalien redan finns tillgänglig från tidigare toxicitetsstudier med upprepad dosering kanske inte avlivningar är vetenskapligt motiverade. Om avlivning är inkluderad i studien, kommer antalet djur i varje dosgrupp som planeras att avlivas normalt vara 10 djur per kön, och det totala antalet djur som ingår i studiens utformning ska ökas med det antal djur som avlivas innan studien slutförs. Ytterligare en grupp kontrolldjur (normalt 5 djur per kön) kan ingå för övervakning av sjukdomsstatus under studien (30), om nödvändigt. Mer vägledning finns i vägledningsdokument nr 116 (7).

Dosgrupper och dosering

21. Vägledning över alla aspekter av valet av dos och dosnivå finns i vägledningsdokument nr 116 (7). Minst tre dosnivåer och en parallell kontroll ska användas. Dosnivåer grundas i allmänhet på resultaten från en korttidsstudie med upprepad dosering eller en spännviddsstudie och bör beakta eventuella toxikokinetiska data som finns tillgängliga om testkemikalien eller närbesläktade kemikalier.
22. Såvida den inte är begränsad genom testkemikalies fysikalisk-kemiska natur eller biologiska verkningar, bör den högsta dosnivån väljas för att identifiera de viktigaste målorganen och de toxiska effekterna, samtidigt som man undviker lidande, svår toxicitet, sjuklighet eller död. Samtidigt som man tar hänsyn till de faktorer som anges nedan i punkt 23, ska den högsta dosnivån väljas för att framkalla tecken på toxicitet, vilket framgår av till exempel en sänkning av kroppsviktökningen (ca 10 %). Dock kan man beroende på målen för studien (se punkt 6), välja en toppdos lägre än den dos som ger tecken på toxicitet, t.ex. om en dos framkallar en negativ effekt som har liten eller ingen påverkan på livslängd eller kroppsvikt.
23. Dosnivåer och dosnivåspridning kan väljas för att etablera en dosrespons och, beroende på testkemikalies verknings sätt, en NOAEL eller andra avsedda resultat från studien t.ex. en BMD (se punkt 25) för den lägsta dosnivån. Faktorer som bör beaktas i placeringen av lägre doser inkluderar den förväntade lutningen för dosrespons-kurvan, de doser vid vilka viktiga förändringar kan uppstå i metabolismen eller den toxiska verknings art, där ett tröskelvärde förväntas eller där en utgångspunkt för lågdosextrapolering förväntas.
24. Den dosnivåspridning som väljs beror på testkemikalies egenskaper och kan inte föreskrivas i denna testmetod, men två- till fyrfaldiga dosintervall ger ofta bra testprestanda för att fastställa fallande dosnivåer, och tillägg av en fjärde testgrupp är att föredra framför användningen av mycket stora intervall (t.ex. mer än en faktor på ca 6–10) mellan doseringarna. I allmänhet bör användningen av faktorer som är större än 10 undvikas, och ska motiveras om de används.
25. Såsom diskuteras vidare i vägledningsdokument nr 116 (7), inkluderar punkter som ska beaktas vid val av dos:
 - Kända eller misstänkta olinjäriteter eller inflexionspunkter i dosresponsen.
 - Toxikokinetik och dosintervall där metabolisk induktion, mättnad eller olinjäritet mellan externa och interna doser uppträder eller ej.
 - Utgångsskador, markörer för verkan eller indikatorer för viktiga underliggande biologiska processer.
 - Nyckelaspekter (eller misstänkta sådana) för verkningsmekanismer, såsom doser vid vilka cytotoxicitet börjar uppstå, hormonnivåerna störs, homeostatiska mekanismer är överväldigande etc.

— Områden i dosrespons-kurvan där en särskilt stabil uppskattning behövs, t.ex. intervallet för förväntad BMD eller ett misstänkt tröskelvärde.

— Beaktande av förväntade exponeringsnivåer för människor.

26. Kontrollgruppen ska vara en obehandlad grupp eller en vehikelkontrollgrupp, om en vehikel används för tillförsel av testkemikalien. Med undantag av behandlingen med testkemikalien, bör djuren i kontrollgruppen hanteras på exakt samma sätt som de i testgrupperna. Om en vehikel används ska kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används bland dosgrupperna. Om en testkemikalie tillförs via kosten och förorsakar ett betydligt minskat intag på grund av mindre välsmakande kost, kan ytterligare en parutfodrad kontrollgrupp vara användbar för en lämpligare kontroll.

Beredning av doser och administrering av testkemikalie

27. Testkemikalien tillförs vanligtvis oralt, via kosten eller dricksvattnet, eller genom sondmatning. Ytterligare information om vägar och metoder för administrering ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 (7). Vägen och metoden för administrering beror på syftet med studien, de fysikalisk-kemiska egenskaperna hos testkemikalien, dess biotillgänglighet och dominerande väg och metod för exponering av människor. En motivering bör ges för vald väg och metod för administrering. Med tanke på djurskydd bör oral sondmatning normalt väljas endast för de ämnen för vilka denna väg och metod för administrering representerar en potentiell mänsklig exponering (t.ex. läkemedel). För kost- eller miljökemikalier inklusive bekämpningsmedel, sker administrering vanligtvis via foder eller dricksvatten. För några situationer, t.ex. arbetsrelaterad exponering, kan administrering via andra vägar vara lämpligare.
28. Vid behov kan testkemikalien upplösas eller suspenderas i en lämplig vehikel. Hänsyn bör tas till följande egenskaper hos vehikeln och andra tillsatser, i förekommande fall: verkningar på absorption, distribution, metabolism eller retention av testkemikalien, verkningar på testkemikalien kemiska egenskaper som kan förändra dess toxiska egenskaper samt påverkan på foder- eller vattenkonsumtion, eller djurens nutritionsstatus. Det rekommenderas, när så är möjligt, att man först använder en vattenbaserad lösning/suspension följt av en lösning/emulsion i olja (t.ex. majsolja) och därefter eventuell lösning i andra vehiklar. För andra vehiklar än vatten bör de toxiska egenskaperna hos vehikeln vara kända. Information om testkemikalien stabilitet och doseringslösningarnas eller fodrets homogenitet (i förekommande fall) enligt villkoren för administreringen (t.ex. kost), bör finnas tillgänglig.
29. För kemikalier som tillförs via foder eller dricksvatten är det viktigt att säkerställa att kvantiteterna av den berörda testkemikalien inte påverkar normal närings- eller vattenbalans. I långtidsstudier med kostadministrering bör koncentrationen av testkemikalien i fodret normalt inte överskrida en övre gräns på 5 % av den totala kosten, för att undvika näringsmässig obalans. När testkemikalien tillförs via kosten, kan antingen en konstant foderkoncentration (mg/kg foder eller ppm) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt (mg/kg kroppsvikt), beräknad på veckobasis, användas. Det alternativ som används ska anges.
30. Vad gäller oral administrering doseras djuren med testkemikalien dagligen (sju dagar per vecka), vanligtvis under en period på 24 månader för gnagare (se också punkt 32). Alla andra doseringsscheman, t.ex. fem dagar per vecka, måste motiveras. När det gäller dermal administrering behandlas djuren normalt med testkemikalien minst 6 timmar per dag, 7 dagar per vecka enligt kapitel B.9 i denna bilaga (11) under en period av 24 månader. Exponering genom inhalation utförs 6 timmar per dag, 7 dagar per vecka, men exponering 5 dagar per vecka kan också användas om detta är motiverat. Exponeringsperioden är normalt en period på 24 månader. Om andra gnagare än råttor utsätts för enbart nos, kan de maximala exponeringstiderna justeras för att minska artspecifikt lidande. En motivering bör ges när man använder en exponeringstid kortare än 6 timmar per dag. Se också kapitel B.8 i denna bilaga (9).
31. När en testkemikalie administreras via sondmatning bör detta ske via en magsond eller en lämplig intubationskanyl vid ungefär samma tid varje dag. Normalt administreras en engångsdos en gång per dag, men om en kemikalie är lokalt irriterande är det möjligt att upprätthålla den dagliga dosen genom delad dos (två gånger per dag). Den största mängd vätska som kan administreras vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör vara så liten som möjligt, och bör normalt inte överstiga 1 ml/100 g kroppsvikt för gnagare (31). Variationer i testvolym bör minimeras genom justering av koncentrationen för att säkerställa en konstant volym vid alla dosnivåer. Potentiellt frätande eller irriterande kemikalier är undantagna, och måste spädas ut för att allvarliga lokala verkningar ska kunna undvikas. Testning vid koncentrationer som sannolikt är frätande eller irriterande för magtarmkanalen bör undvikas.

Studiens varaktighet

32. Studiens varaktighet är normalt 24 månader för gnagare, vilket motsvarar huvuddelen av livslängden för de djur som används. Kortare eller längre varaktigheter kan användas, beroende på livslängden för djurarten i studien, men bör motiveras. För specifika stammar av möss t.ex. AKR/J-, C3H/J- eller C57BL/6J-stammar kan en varaktighet på 18 månader vara mer lämplig. Det följande ger viss vägledning avseende varaktighet, studiens upphörande och överlevnad, ytterligare riktlinjer som inbegriper en bedömning av huruvida en negativ karcinogenicitet förhåller sig till överlevnad i studien ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 om utformning och genomförande av studier om kronisk toxicitet och karcinogenicitet (7).
- Studiens upphörande bör beaktas när antalet överlevare i de lägre dosgrupperna understiger 25 procent.
 - I de fall där endast högdosgruppen dör i förtid på grund av toxicitet bör detta inte leda till upphörande av studien.
 - Överlevnad för vardera kön ska beaktas för sig.
 - Studien bör inte fortsätta över den punkt där tillgängliga data från studien inte längre är tillräckliga för att ge en statistisk giltig utvärdering.

IAKTTAGELSER

33. Samtliga djur bör observeras beträffande sjuklighet eller mortalitet, vanligtvis i början och slutet av varje dag, inklusive helger och helgdagar. Djuren bör dessutom kontrolleras en gång per dag för särskilda tecken med toxikologisk relevans, med beaktande av maximalt förväntade effekter efter dosering med sondmatning. Särskild uppmärksamhet bör ges åt tumörutveckling och tidpunkten för tumörens uppkomst, plats, mått, utseende, och utvecklingen av varje tydlig eller kännbar tumör ska registreras.

Kroppsvikt, foder-/vattenkonsumtion och fodereffektivitet

34. Samtliga djur bör vägas vid behandlingens början, minst en gång i veckan de första 13 veckorna och därefter minst en gång per månad. Mätningar av foderkonsumtion och fodereffektivitet bör minst göras varje vecka de 13 första veckorna och därefter minst en gång per månad. Vattenkonsumtionen bör mätas minst en gång per vecka de 13 första veckorna, och därefter minst en gång per månad, när testkemikalien administreras via dricksvattnet. Mätningar av vattenkonsumtionen bör också övervägas för studier där vattendrickandet förändras.

Hematologiska, kliniska biokemiska och andra mätningar

35. För att maximera informationen som erhållits från studien, särskilt överväganden gällande verkningssätt, kan blodprover tas för hematologi och klinisk biokemi, och detta efter bedömning av försöksledaren. Urinanalys kan även vara lämplig. Ytterligare vägledning om värdet med att ta sådana prov som en del av en karcinogenicitetsstudie finns i vägledningsdokument nr 116 (7). Om det anses lämpligt kan blodprov för hematologiska och kliniska biokemiska bestämningar och urinanalys utföras som en del i en avlivning (punkt 20) och vid studiens slut på minst 10 djur per kön och grupp. Blodprover bör tas under narkos från ett angivet ställe, till exempel genom hjärtpunktering eller från retro-orbitalsinus under narkos, och lagras, om tillämpligt, under lämpliga förhållanden. Blodtstryk kan också beredas för undersökning, särskilt om benmärgen verkar vara målorganet, även om värdet av en sådan undersökning för bestämning av karcinogen/onkogen potential har ifrågasatts (32).

PATOLOGI

Obduktion

36. Samtliga djur i studien med undantag av kontrolldjur (se punkt 20) och andra satellitgrupper, bör underkastas en fullständig obduktion som omfattar omsorgsfull granskning av kroppens yttre ytor, alla kroppsöppningar samt kranium, bröst- och bukhåla och deras innehåll. Obduktion kan från fall till fall krävas av indikatordjur och andra satellitdjur efter beslut av försöksledaren. Organvikter är normalt inte en del av en karcinogen studie, eftersom geriatriska förändringar och, i senare skeden, utvecklingen av tumörer förvirrar användbarheten av organviktsdatan. De kan dock vara avgörande för att göra en sammanvägd bedömning, och särskilt för överväganden beträffande verkningssätt. Om de är en del av en satellitstudie bör de inte samlas in senare än ett år efter studiens inledning.
37. Följande vävnader bör bevaras i det mest lämpade fixeringsmedlet för både vävnadstypen och den planerade efterföljande histopatologiska undersökningen (33) (vävnader inom hakparenteser är valfria):

alla större skador	hjärta	pankreas	mage (förmagen, glandulärmagen)
binjure	ileum	bisköldkörtel	[tänder]
aorta	jejunum	perifer nerv	testikel
hjärna (inklusive delar av cerebrum, cerebellum och medulla/pons)	njure	hypofys	tymus
cekum	tårkörtel (exorbital)	prostata	sköldkörtel
cervix	lever	rektum	[tunga]
koagulerande körtel	lunga	spottkörtel	trakea
kolon	lymfkörtlar (både ytliga och djupa)	sädesblåsa	urinblåsa
tolvfingertarm	bröstkörtel (obligatorisk för honor, och om synlig och dissekeringsbar hos hanar)	skelettmuskel	uterus (inklusive cervix)
bitestikel	[övre luftvägarna, inklusive nos, turbinates och bihålorna]	hud	[ureter]
öga (inklusive näthinna)	esofagus	ryggmärg (på tre nivåer: cervikal, mitt på bröstkorgen och ländryggen)	[uretra]
[lårben med led]	[luktbulb]	mjälte	vagina
gallblåsa (för andra arter än råtta)	äggstock	[bröstben],	snitt av ryggmärgen och/eller ett färskt benmärgs-aspirat
Harderiankörtel			

När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen bevaras. Kliniska och andra fynd kan indikera behovet av att undersöka ytterligare vävnader. Alla organ som sannolikt är målorgan, baserat på kunskap om testkemikaliers egenskaper, ska också konserveras. I studier som inbegriper administrering via huden bör organen som anges för oralt intag bevaras, och det är viktigt med särskild provtagning och bevarande av huden där appliceringen har skett. I inhalationsstudier bör förteckningen över bevarade och undersökta vävnader från luftvägarna följa rekommendationerna i kapitlen B.8 och B.29 i denna bilaga. För andra organ/vävnader (och i tillägg till de specifikt bevarade vävnaderna från luftvägarna) bör de organ som finns i förteckningen som anges för den orala vägen undersökas.

Histopatologi

38. Vägledning finns tillgänglig om bästa praxis vid genomförande av studier gällande toxikologisk patologi (33). De vävnader som minst ska undersökas är:

- Alla vävnader från högdos- och kontrollgrupperna.
- Alla vävnader från djur som dör eller avlivas under studien.
- Alla vävnader som uppvisar makroskopiska abnormaliteter, inklusive tumörer.
- När behandlingsrelaterade histopatologiska förändringar observeras i högdosgruppen, ska samma vävnader från samtliga djur i alla andra dosgrupper undersökas.
- När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen undersökas.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

39. Individuella data för samtliga utvärderade parametrar bör ges. Därutöver bör alla data sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antal djur vid testets början, antal djur som påfanns döda under testet eller som avlivats av humanitära skäl och tidpunkten för dödsfallen eller avlivningen, antal djur som visar tecken på toxicitet, en beskrivning av de tecken på toxicitet som observerats, inklusive tidpunkt för de första tecknen, varaktighet och hur allvarliga de toxiska verkningarna är, antal djur som uppvisar skador, typ av skador och procentandelen djur för varje typ av skada. Sammanfattande tabeller bör ge medelvärden och standardavvikelser (för kontinuerliga testdata) för djur som uppvisar toxiska effekter eller skador, i tillägg till skadornas gradering.
40. Historiska kontrolldata kan vara värdefulla vid tolkningen av studiens resultat, t.ex. i de fall då det finns indikationer på att de data som lämnats från de parallella kontrollerna i huvudsak avviker jämfört med aktuell data från kontrolldjuren från samma testanläggning/-koloni. Historiska kontrolldata, om de har utvärderats, bör lämnas in från samma laboratorium och relatera till djur i samma ålder och av samma stam som genererats under de fem år som föregick studien i fråga.
41. När det är tillämpligt bör numeriska resultat utvärderas genom en lämplig och allmänt vedertagen statistisk metod. Vid utformningen av studien bör de statistiska metoderna och datan som ska analyseras väljas (punkt 9). Valet bör innehålla bestämmelser om överlevnadsjusteringar, där så krävs.

Testrapport

42. Testrapporten ska omfatta följande information:

Testkemikalie:

- Fysikalisk natur, renhet och fysikalisk-kemiska egenskaper.
- Identifikationsuppgifter.
- Kemikalies källa.
- Satsnummer.
- Intyg om kemisk analys.

Vehikel (i förekommande fall):

- Motivering för val av vehikel (om annan än vatten).

Försöksdjur:

- Art/stam som används och motivering av valet.
- Djurens antal, ålder och kön vid testets början.
- Ursprung, inhysning, kost etc.
- Djurens individuella vikt vid testets början.

Försöksbetingelser:

- Grund för administreringsätt och dosval.
- I förekommande fall, de statistiska metoderna som använts för att analysera datan.
- Uppgifter om testkemikalies sammansättning/foderberedning.
- Analysdata om beredningens uppnådda koncentration, stabilitet och homogenitet.

- Administreringsätt och uppgifter om testkemikaliens administrering.
- Om enbart nos eller helkropp vid inhalationsstudier.
- Faktiska doser (mg/kg kroppsvikt/dag) och omräkningsfaktor för kostens/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (mg/kg eller ppm) till den faktiska dosen, om tillämpligt.
- Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

Resultat (sammanfattande data i tabellform och enskilda djurdata ska presenteras)

Allmänt

- Överlevnadsdata.
- Kroppsvikt/kroppsviktsförändringar.
- Foderförbrukning, beräkningar av fodereffektivitet, om det har utförts, och vattenförbrukning, om tillämpligt.
- Toxikokinetiska data (om tillgängligt).
- Oftalmoskopi (om tillgängligt).
- Hematologi (om tillgängligt).
- Klinisk kemi (om tillgängligt).

Kliniska fynd

- Tecken på toxicitet.
- Förekomst (och allvarlighetsgrad) av eventuell abnormitet.
- Art, allvarlighetsgrad och varaktighet för kliniska observationer (huruvida de är övergående eller permanenta).

Obduktionsdata

- Terminal kroppsvikt.
- Organvikter och deras förhållanden, om tillämpligt.
- Obduktionsfynd, abnormaliteternas förekomst och allvarlighetsgrad.

Histopatologi

- Icke-neoplastiska histopatologiska fynd.
- Neoplastiska histopatologiska fynd.
- Sambandet mellan grova och mikroskopiska fynd.
- Detaljerad beskrivning av alla behandlingsrelaterade histopatologiska fynd, inklusive allvarlighetsgradering.

— Rapport om eventuell inbördes granskning av bilder.

Statistisk bearbetning av resultaten, när så är lämpligt

Diskussion av resultaten, inklusive:

- Diskussion om eventuella modellstrategier.
- Dos-responsförhållanden.
- Historiska kontrolldata.
- Beaktande av eventuell information om verkningssätt.
- BMD-, NOAEL- eller LOAEL-bestämning.
- Relevans för människor.

Slutsatser

LITTERATUR

- (1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.
- (3) Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.
- (4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145–191.
- (5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.
- (6) Kapitel B.27 i denna bilaga, test avseende subkronisk oral toxicitet (90-dagars upprepat oraltest på icke-nagare).
- (7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.
- (8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO (2009) 28, OECD, Paris.
- (9) Kapitel B.8 i denna bilaga, subakut inhalationstoxicitet: 28 dagars studie.
- (10) Kapitel B.29 i denna bilaga, subkronisk inhalationstoxicitet: 90-dagars studie.
- (11) Kapitel B.9 i denna bilaga, toxicitet vid upprepad dosering (28 dagar, dermalt).
- (12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793–801.
- (13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, and Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: an overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581–589.

- (14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. *Toxicol. Sci.* 89:51–56.
- (15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. *Crit. Rev. Toxicol.* 33:591–653.
- (16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 1–7.
- (17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9–35.
- (18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 37–68.
- (19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 69–98.
- (20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
- (21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West, W, Olin S(2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729–837.
- (23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1):214.
- (25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). *Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation*. Queen's University Press, Belfast. s. 279–284.
- (26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect.* 105:1196–1203.
- (27) Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål, EUT L 276, 20.10.2010, s. 33–79.
- (28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86–23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.
- (29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

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

Tillägg 1

DEFINITION

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

B. 33 KOMBINERAD KRONISK TOXICITETS-/KARCINOGENICITETSSTUDIE

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 453 (2009). Den ursprungliga TG 453 antogs 1981. Utvecklingen av denna uppdaterade testmetod B.33 ansågs nödvändig för att återspegla den senaste utvecklingen inom djurskydd och myndighetskrav (1) (2) (3) (4) (5). Uppdateringen av denna testmetod B.33 har genomförts parallellt med revideringen av kapitel B.32 i denna bilaga, karcinogenicitetsstudier, och kapitel B.30 i denna bilaga, kroniska toxicitetsstudier, i syfte att erhålla ytterligare information om djuren som används i studien och ge ytterligare detaljer om val av dos. Den här testmetoden är avsedd att användas vid testning av ett brett spektrum av kemikalier, inklusive bekämpningsmedel och industrikemikalier. Det bör påpekas att vissa detaljer och krav kan variera för läkemedel (se internationella konferensen om harmonisering (ICH) vägledning S1B om testning av cancerframkallande läkemedel).
2. Majoriteten av kroniska toxicitetsstudier och karcinogenicitetsstudier genomförs med gnagare, och den här testmetoden är främst avsedd för studier som genomförs med dessa arter. Skulle sådana studier krävas för icke-gnagare gäller också de principer och förfaranden som beskrivs i denna testmetod, med lämpliga modifieringar, tillsammans med dem i kapitel B.27 i denna bilaga, 90-dagars oral toxicitetsstudie på icke-gnagare (6), som beskrivs i OECD:s vägledningsdokument nr 116 om utformning och genomförande av studier om kronisk toxicitet och karcinogenicitet (7).
3. De tre huvudsakliga administrationssätten som används i kroniska toxicitets-/karcinogenicitetsstudier är oral, dermal och inhalation. Valet av administrerings sätt beror på de fysikaliska och kemiska egenskaperna hos testkemikalien och det dominerande exponeringssättet för människor. Ytterligare information om val av exponeringssätt ges i vägledningsdokument nr 116 (7).
4. Den här testmetoden fokuserar på exponering via oralt intag, det intag som används mest i kroniska toxicitets- och karcinogenicitetsstudier. Även om långsiktiga studier som medför exponering via huden eller inhalation kan vara nödvändiga för riskbedömning av människors hälsa och/eller kan krävas under vissa regelverk, så innebär båda exponeringsvägarna en betydande teknisk komplexitet. Sådana studier måste utformas från fall till fall, även om testmetoden som beskrivs här för bedömningen och utvärderingen av kronisk toxicitet och karcinogenicitet skulle kunna utgöra grunden för ett protokoll för inhalations- och/eller hudstudier, med hänsyn tagen till rekommendationer om behandlingsperioder, kliniska eller patologiska parametrar etc. OECD:s vägledning finns tillgänglig om administrering av testkemikalier via inhalation (7) (8) och genom huden (7). Kapitel B.8 i denna bilaga (9) och kapitel B.29 i denna bilaga (10), tillsammans med OECD:s vägledningsdokument om akut inhalationstestning (8), bör särskilt rådfrågas vid utformningen av långsiktiga studier som inbegriper exponering via inhalation. Kapitel B.9 i denna bilaga (11) bör rådfrågas när det gäller testning som utförs via huden.
5. Den kombinerade kronisk toxicitet/karcinogenicitetsstudien ger information om möjliga hälsofaror som sannolikt kan uppstå vid upprepad exponering under en period som varar upp till hela livslängden för de arter som används. Studien ger information om de toxiska effekterna hos testkemikalien, inklusive potentiell karcinogenicitet, indikation om målorgan och möjlig ackumulering. Den kan ge en uppskattning av den icke-observerade nivån för skadliga biverkningar och, i fallet med icke-genotoxiska karcinogener, för tumörresponser som kan användas för att fastställa säkerhetskriterier för exponering av människor. Behovet av noggranna kliniska observationer av djuren i syfte att få fram så mycket information som möjligt betonas också.
6. Målen för kroniska toxicitets-/karcinogenicitetsstudier som omfattas av denna testmetod inkluderar:
 - Identifieringen av de cancerframkallande egenskaperna hos en testkemikalie, vilka leder till en ökad incidens av tumörer, ökad andel maligna tumörer eller en minskning av tiden till uppkomst av tumörer, jämfört med parallella kontrollgrupper.
 - Fastställandet av tiden till uppkomst av tumörer.
 - Identifieringen av den kroniska toxiciteten hos testkemikalien.

- Identifieringen av målorgan(en) för kronisk toxicitet/karcinogenicitet.
- Karakterisering av förhållandet dos:respons.
- Identifieringen av nivån där ingen skadlig effekt observeras (NOAEL) eller utgångspunkten för upprättandet av en referensdos (BMD).
- Framtida konsekvenser av karcinogena effekter vid mänsklig exponering av lågdosnivåer.
- Förutsägelse av kroniska toxiska effekter på nivåer för mänsklig exponering.
- Tillhandahållande av data för att testa hypoteser om verkningsätt (2) (7) (12) (13) (14) (15).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

7. Vid bedömningen och utvärderingen av den potentiella karcinogeniciteten och den kroniska toxiciteten hos en testkemikalie bör all tillgänglig information om testkemikalien beaktas av testlaboratoriet innan studien genomförs, i syfte att fokusera på utformningen av studien för att mer effektivt testa dess toxikologiska egenskaper och minimera användningen av djur. Information om, och hänsyn till, verkningsmekanismen hos ett cancerframkallande ämne (2) (7) (12) (13) (14) (15) är särskilt viktig, eftersom den optimala utformningen kan variera beroende på om testkemikalien är en känd eller misstänkt genotoxisk karcinogen. Ytterligare vägledning om beaktande av verkningsätt finns i vägledningsdokument nr 116 (7).
8. Information som underlättar studiens utformning inkluderar identitet, kemisk struktur, och fysikalisk-kemiska egenskaper hos testkemikalien, eventuell information om verkningsätt, resultat från eventuella in vitro- eller in vivo-genotoxicitetstester; förväntad(e) användning(ar) och risken för mänsklig exponering, tillgängliga (Q)SAR-data, mutagenicitet/genotoxicitet, karcinogenicitet och toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier, tillgängliga toxikokinetiska data (engångsdos- och upprepad dos-kinetik om det finns tillgängligt) och data från andra studier med upprepad exponering. Fastställandet av kronisk toxicitet/karcinogenicitet bör endast utföras efter att inledande information om toxicitet har erhållits från 28-dagars och/eller 90-dagars tester med upprepad dosering. Kortsiktiga initieringsfrämjande cancertester kan också ge användbar information. Ett stegvist förhållningssätt till testning av karcinogenicitet bör betraktas som en del av den övergripande bedömningen av de potentiella hälsoeffekterna för en viss testkemikalie (16) (17) (18) (19).
9. De statistiska metoder som är mest lämpade för analys av resultaten, med tanke på försöksutformningen och målen, bör fastställas innan studien påbörjas. Frågor att överväga inkluderar huruvida statistiken bör innefatta justering av överlevnad, analys av kumulativa tumörrisker i förhållande till överlevnadsvaraktighet, analys av tiden till tumören och analys i händelse av förtida terminering av en eller fler grupper. Vägledning om lämpliga statistiska analyser och viktiga referenser till internationellt erkända statistiska metoder ges i vägledningsdokument nr 116 (7), samt i vägledningsdokument nr 35 om analys och utvärdering av studier över kronisk toxicitet och karcinogenicitet (20).
10. Vid genomförandet av en studie om karcinogenicitet bör man alltid följa de vägledande principer och överväganden som beskrivs i OECD:s vägledningsdokument om erkännande, bedömning och användning av kliniska tecken som humana endpoints för försöksdjur som används i säkerhetsbedömningen (21). Se särskilt punkt 62. Detta avsnitt anger att "I studier med upprepad dosering när ett djur visar kliniska tecken som är progressiva, vilket leder till ytterligare försämring av tillståndet, bör ett välgrundat beslut tas om man ska eller inte ska avliva djuret av humanitära skäl. Beslutet bör även omfatta övervägandet av värdet av informationen som fås genom fortsatt skötsel av det djuret i studien i förhållande till dess övergripande tillstånd. Om ett beslut har tagits att låta djuret kvarstå i testet, bör observationsfrekvensen ökas vid behov. Det är också möjligt, utan att allvarligt påverka syftet med testet, att tillfälligt upphöra med doseringen om det kan minska smärtan eller lidandet, eller att minska testdosen."
11. Detaljerad vägledning om och diskussion om principerna för valet av dos för studier om kronisk toxicitet och karcinogenicitet finns i vägledningsdokument nr 116 (7) samt i två internationella publikationer från Life Sciences Institute (22) (23). Den centrala strategin för valet av dos är beroende av det primära målet eller målen med studien (punkt 6). Vid val av lämpliga dosnivåer bör en balans uppnås mellan farundersökning å ena sidan och karakterisering av lågdosrespons och deras betydelse å andra sidan. Detta är särskilt relevant när det gäller denna kombinerade kroniska toxicitets- och karcinogenicitetsstudie.

12. Man bör överväga att genomföra denna kombinerade studie av kronisk toxicitet och karcinogenicitet, snarare än ett separat utförande av en studie av kronisk toxicitet (kapitel B.30 i denna bilaga) och en studie av karcinogenicitet (kapitel B.32 i denna bilaga). Det kombinerade testet ger större effektivitet vad gäller tid och kostnad, och en viss minskning av djuranvändning jämfört med att jämföra två separata studier, utan att man kompromissar med datakvaliteten i antingen den kroniska eller karcinogena fasen. Noggrant övervägande bör dock ges av principerna för valet av dos (punkterna 11 och 22–26) vid en kombinerad studie av kronisk toxicitet och karcinogenicitet, och det är också erkänt att separata studier kan krävas under vissa regelverk. Ytterligare vägledning om utformningen av den kombinerade kroniska toxicitets- och karcinogenicitetsstudien för att uppnå maximal studieprestanda när det gäller möjligheterna att minska antalet djur som används, så väl som rationalisering av de olika försöksförfaranden finns i vägledningsdokument nr 116 (7).
13. Definitioner som används inom ramen för den här metoden finns i slutet av det här kapitlet och i vägledningsdokument nr 116 (7).

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

14. Studien är utformad med två parallella faser, en kronisk fas och karcinogenicitetsfas (se respektive punkt 34 och 35 för varaktighet). Testkemikalien administreras normalt oralt även om inhalation eller via huden också kan vara lämpligt. För den kroniska fasen administreras testkemikalien dagligen i graderade doser till flera grupper försöksdjur, en dosnivå per grupp, i allmänhet under en 12-månadersperiod, även om kortare eller längre varaktigheter kan väljas beroende på myndighetskrav (se punkt 34). Denna längd är vald för att vara tillräckligt lång för att eventuella effekter av kumulativ toxicitet blir uppenbara, utan de störande effekterna av geriatriska förändringar. Studiens utformning kan även omfatta en eller flera avlivningar t.ex. vid 3 eller 6 månader, och ytterligare djur kan inkluderas för att tillgodose detta (se punkt 20). För karcinogenicitetsfasen administreras testkemikalien dagligen till flera grupper av försöksdjur under en större del av deras livslängd. Djuren observeras noggrant i båda faserna avseende tecken på toxicitet och utvecklingen av neoplastiska skador. Djur som dör eller avlivas under testet obduceras, och i slutet av testet avlivas överlevande djur och obduceras.

METODBESKRIVNING

Val av djurart

15. Den här testmetoden täcker främst bedömning och utvärdering av kronisk toxicitet och karcinogenicitet hos gnagare (punkt 2). Användningen av icke-gnagare kan övervägas när tillgängliga data tyder på att de är mer relevanta för förutsägelser av hälsoeffekter på människor. Valet av art bör motiveras. Rekommenderad gnagare är råttor, även om andra gnagare t.ex. mus kan användas. Även om användningen av möss i karcinogenicitets-tester kan ha begränsad användbarhet (24) (25) (26), krävs fortfarande karcinogenicitetstester med möss under några aktuella regelverk såvida det inte kan fastställas att en sådan studie inte är vetenskapligt nödvändig. Råttor och möss har föredragits på grund av deras relativt korta livslängd, deras breda användning i farmakologiska och toxikologiska studier, deras känslighet för tumörinduktion och tillgången på stammar som beskrivits tillräckligt ingående. Som en följd av dessa egenskaper finns en stor mängd information tillgänglig om deras fysiologi och patologi. Utformning och genomförande av kroniska toxicitets-/karcinogenicitetsstudier i icke-gnagare, när så krävs, bör baseras på de principer som beskrivs i denna testmetod tillsammans med dem i kapitel B.27 i denna bilaga, 90-dagars oral toxicitetsstudie på icke-gnagare med upprepad dosering (6). Ytterligare information om val av arter och stam ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 (7).
16. I testet bör unga friska vuxna djur användas av stammar som vanligtvis används på laboratorier. Den kombinerade kroniska toxicitets-/karcinogenicitetsstudien bör utföras på djur från samma stam och ursprung som de som användes i den inledande toxicitetsstudien(erna) med kortare varaktighet, dock, om djur från samma stam och ursprung är kända för att ge problem med att uppnå det normalt accepterade kriteriet för överlevnad i långsiktiga studier (se vägledningsdokument nr 116 (7)), bör man överväga att använda en stam med acceptabel överlevnadsgrad för den långsiktiga studien. Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

17. Djuren kan inhysas individuellt, eller i små grupper av samma kön; individuell inhysning ska endast övervägas om det är vetenskapligt motiverat (27) (28) (29). Burarna bör placeras så att en möjlig påverkan beroende på deras placering minimeras. Temperaturen i försöksdjurens utrymme bör vara 22 °C (± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och helst inte överstiga 70 % utom när rummet rengörs, och målet bör vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell, med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas med ett obegränsat utbud av dricksvatten. Kosten ska uppfylla alla näringsmässiga krav för arterna som testas och innehållet av föroreningar i kosten som kan påverka testresultatet inkluderar, men är ej begränsade till, bekämpningsmedelsrester, långlivade organiska föroreningar, fitoöstrogener, tungmetaller och mykotoxiner, och bör vara så låga som möjligt. Analytisk information om närings- och kostföroreningsnivåer bör genereras periodiskt, åtminstone i början av studien och när

det finns en förändring i det använda partiet, och bör ingå i den slutliga rapporten. Analytisk information om dricksvattnet som används i studien ska likaledes ingå. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie och för att tillgodose djurens näringsbehov när testkemikalien tillförs genom kosten.

Förberedelse av djuren

18. Friska djur, som har aklimatiserat sig till laboratoriets betingelser i minst 7 dagar och inte tidigare har ingått i försök, ska användas. När det gäller gnagare bör doseringen av djuren påbörjas snarast möjligt efter avvänjning och aklimatisering, och helst innan djuren är 8 veckor gamla. Försöksdjuren bör karakteriseras efter art, stam, ursprung, kön, vikt och ålder. Vid undersökningens början bör viktvariationen hos varje kön vara minimal och inte överstiga $\pm 20\%$ av medelvikten för alla djur inom studien, separat för varje kön. Djuren fördelas slumpvis i kontroll- och behandlingsgrupperna. Efter randomiseringen bör det inte finnas några signifikanta skillnader i genomsnittliga kroppsvikter mellan grupper inom varje kön. Om det finns statistiskt signifikanta skillnader, bör randomiseringssteget upprepas, om möjligt. Varje djur bör tilldelas ett unikt identifikationsnummer, och märkas permanent med detta nummer genom tatuering, mikrochipimplantat, eller med annan lämplig metod.

PROCEDUR

Djurens antal och kön

19. Bägge könen ska användas. Ett tillräckligt antal djur ska användas så att en grundlig biologisk och statistisk utvärdering är möjlig. För gnagare ska varje dosgrupp (som beskrivs i punkt 22) och parallell kontrollgrupp för studiens karcinogenicitetsfas innehålla minst 50 djur av varje kön. Beroende på syftet med studien finns det möjlighet att öka den statistiska giltigheten för de viktigaste uppskattningarna genom att fördela djuren ojämnt till de olika dosgrupperna, med t.ex. fler än 50 djur i lågdosgruppen, för att uppskatta den cancerframkallande potentialen i låga doser. Det ska dock erkännas att en måttlig ökning av gruppstorlek ger en relativt liten ökning av den statistiska giltigheten för studien. Varje dosgrupp (som beskrivs i punkt 22) och parallell kontrollgrupp för studiens kroniska toxicitetsfas bör innehålla minst 10 djur av varje kön när det gäller gnagare. Det bör noteras att denna siffra är lägre än i studien för kronisk toxicitet (kapitel B.30 i denna bilaga). Tolkningen av data från det minskade antalet djur per grupp i den kroniska toxicitetsfasen i denna kombinerade studie kommer dock att stödjas av data från det större antalet djur i studiens karcinogenicitetsfas. I studier där möss ingår behövs fler djur i varje dosgrupp för den kroniska toxicitetsfasen för att genomföra alla nödvändiga hematologiska bestämningar. Ytterligare information om statistisk utformning av studien och val av dosnivåer för att maximera den statistiska giltigheten finns i vägledningsdokument nr 116 (7).

Avsättningar för avlivningar, satellitgrupp och kontrolldjur.

20. Studien får föreskriva avlivningar efter t.ex. 6 månader för den kroniska toxicitetsfasen för att få information om framskridandet av icke-neoplastiska förändringar och mekanistisk information, om det är vetenskapligt motiverat. Om sådan information om testkemikalien redan finns tillgänglig från tidigare toxicitetsstudier med upprepad dosering kanske inte avlivningar är vetenskapligt motiverade. De djur som används i den kroniska toxicitetsfasen, normalt 12 månaders varaktighet (punkt 34) ger avlivningsdata för den karcinogena fasen i studien, på så sätt uppnås ett totalt minskat antal djur. Satellitgrupper kan också ingå i den kroniska toxicitetsfasen av studien, för att övervaka reversibiliteten av eventuella toxikologiska förändringar som orsakats av den testkemikalie som undersöks. Dessa kan begränsas till studiens högsta dosnivå plus kontroll. Ytterligare en grupp kontrolldjur (normalt 5 djur per kön) kan ingå för övervakning av sjukdomsstatus under studien (30), om nödvändigt. Ytterligare vägledning om studiens utformning för att omfatta avlivningar, satellit- och kontrolldjur, samtidigt som antalet djur som används totalt minskas ges i vägledningsdokument nr 116 (7).
21. Om satellitdjur och/eller avlivningar inkluderas i studien, kommer antalet djur i varje dosgrupp som inkluderas i detta syfte normalt vara 10 djur per kön, och det totala antalet djur som ingår i studiens utformning ska ökas med det antal djur som planeras att avlivas innan studien slutförs. Avlivningar och satellitdjur bör normalt genomgå samma observationer, inklusive kroppsvikt, foder-/vattenkonsumtion, hematologiska och kliniska biokemiska mätningar och patologiska undersökningar som djuren i den kroniska toxicitetsfasen i huvudstudien, även om avsättningar också kan göras (i avlivningsgruppen) för att mätningar ska begränsas till vissa viktiga mätningar såsom neurotoxicitet eller immunotoxicitet.

Dosgrupper och dosering

22. Vägledning över alla aspekter av valet av dos och dosnivå finns i vägledningsdokument nr 116 (7). Minst tre dosnivåer och en parallell kontrollgrupp ska användas, för både den kroniska fasen och karcinogenicitetsfasen. Dosnivåer grundas i allmänhet på resultaten från en korttidsstudie med upprepad dosering eller en spännviddsstudie och bör beakta eventuella toxikokinetiska data som finns tillgängliga om testkemikalien eller närbesläktade kemikalier.

23. För den kroniska toxicitetsfasen, kan en fullständig studie med tre dosnivåer inte anses vara nödvändig om det är troligt att en studie med en dosnivå på motsvarande minst 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag inte ger några skadliga effekter. Detta bör baseras på information från inledande studier och med hänsyn till att toxicitet inte förväntas baserat på data från strukturellt närbesläktade kemikalier. En gräns på 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag kan tillämpas, utom när mänsklig exponering anger att en högre dosnivå ska användas.
24. Såvida den inte är begränsad genom testkemikalies fysikalisk-kemiska natur eller biologiska verkningar, bör den högsta dosnivån väljas för att identifiera de viktigaste målorganen och de toxiska effekterna, samtidigt som man undviker lidande, svår toxicitet, sjuklighet eller död. Den högsta dosnivån ska normalt väljas för att framkalla tecken på toxicitet, vilket t.ex. framgår av en minskning av kroppens viktökning (ca 10 %). Dock kan beroende på målen för studien (se punkt 6), en övre dos lägre än den dos som ger tecken på toxicitet väljas, t.ex. om en dos framkallar en negativ effekt som har försumbar eller ingen påverkan på livslängd eller kroppsvikt.
25. Dosnivåer och dosnivåspridning kan väljas för att etablera en dosrespons och, beroende av testkemikalies verkningssätt, en NOAEL eller andra avsedda resultat från studien t.ex. en BMD (se punkt 27). Faktorer som bör beaktas i placeringen av lägre doser inkluderar den förväntade lutningen för dosrespons-kurvan, de doser vid vilka viktiga förändringar kan uppstå i metabolismen eller den toxiska verkningens art, där ett tröskelvärde förväntas eller där en utgångspunkt för lågdosextrapolering förväntas. Vid genomförandet av en kombinerad karcinogenicitets-/kronisk toxicitetsstudie, är det primära målet att erhålla information för riskbedömning beträffande karcinogenicitet, och information om kronisk toxicitet är normalt ett delmål. Detta bör beaktas vid val av dosnivåer och dosnivåspridning för studien.
26. Den dosnivåspridning som väljs beror på målen med studien och testkemikalies egenskaper, och kan inte föreskrivas i detalj i denna testmetod, men två- till fyrfaldiga dosintervall ger ofta bra testprestanda för att fastställa fallande dosnivåer, och tillägg av en fjärde testgrupp är att föredra framför användningen av mycket stora intervall (t.ex. mer än en faktor på ca 6–10) mellan doseringarna. I allmänhet bör användningen av faktorer som är större än 10 undvikas och motiveras om de används.
27. Såsom vidare beskrivits i vägledningsdokument nr 116 (7), inkluderar punkter som ska beaktas vid valet av dos:
- Kända eller misstänkta olinjäriteter eller inflexionspunkter i dosresponsen.
 - Tokikokinetik och dosintervall där metabolisk induktion, mättnad eller olinjäritet mellan externa och interna doser uppträder eller ej.
 - Utgångsskador, markörer för verkan eller indikatorer för viktiga underliggande biologiska processer.
 - Nyckelaspekter (eller misstänkta sådana) för verkningsmekanismer, såsom doser vid vilka cytotoxicitet börjar uppstå, hormonnivåerna störs, homeostatiska mekanismer är överväldigande etc.
 - Områden i dosrespons-kurvan där en särskilt stabil uppskattning behövs, t.ex. intervallet för förväntad BMD eller ett misstänkt tröskelvärde.
 - Beaktande av förväntade exponeringsnivåer för människor, särskilt vid valet av mellan- och lågdoser.
28. Kontrollgruppen ska vara en obehandlad grupp eller en vehikelkontrollgrupp, om en vehikel används för tillförsel av testkemikalien. Med undantag av behandlingen med testkemikalien, bör djuren i kontrollgruppen hanteras på exakt samma sätt som de i testgrupperna. Om en vehikel används ska kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används bland dosgrupperna. Om en testkemikalie tillförs via kosten och förorsakar ett betydligt minskat intag på grund av mindre välsmakande kost, kan ytterligare en parutfodrad kontrollgrupp vara användbar för en lämpligare kontroll.

Beredning av doser och administrering av testkemikalie

29. Testkemikalien tillförs vanligtvis oralt, via kosten eller dricksvattnet, eller genom sondmatning. Ytterligare information om vägar och metoder för administrering ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 (7). Vägen och metoden för administrering beror på syftet med studien, de fysikalisk/kemiska egenskaperna hos testkemikalien, dess biotillgänglighet, och dominerande väg och metod för exponering av människor. En motivering bör ges för vald väg och metod för administrering. Med tanke på djurskydd bör oral sondmatning normalt väljas endast för de ämnen för vilka denna väg och metod för administrering representerar en potentiell mänsklig

exponering (t.ex. läkemedel). För kost- eller miljökemikalier inklusive bekämpningsmedel, sker administrering vanligtvis via foder eller dricksvatten. För några situationer, t.ex. arbetsrelaterad exponering, kan administrering via andra vägar vara lämpligare.

30. Vid behov kan testkemikalien upplösas eller suspenderas i en lämplig vehikel. Hänsyn bör tas till följande egenskaper hos vehikeln och andra tillsatssämnen, i förekommande fall: verkningar på absorption, distribution, metabolism eller retention av testkemikalien, verkningar på testkemikaliens kemiska egenskaper som kan förändra dess toxiska egenskaper samt påverkan på foder- eller vattenkonsumtion, eller djurens nutritionstatus. Det rekommenderas, när så är möjligt, att man först använder en vattenbaserad lösning/suspension följt av en lösning/emulsion i olja (t.ex. majsolja) och därefter eventuell lösning i andra vehiklar. För andra vehiklar än vatten bör de toxiska egenskaperna hos vehikeln vara kända. Information om testkemikaliens stabilitet och doseringslösningarnas eller fodrets homogenitet (i förekommande fall) enligt villkoren för administreringen (t.ex. kost), bör finnas tillgänglig.
31. För kemikalier som tillförs via foder eller dricksvatten är det viktigt att säkerställa att kvantiteterna av den berörda testkemikalien inte påverkar normal närings- eller vattenbalans. I långtidsstudier med kostadministrering bör koncentrationen av testkemikalien i fodret normalt inte överskrida en övre gräns på 5 % av den totala kosten, för att undvika näringsmässig obalans. När testkemikalien tillförs via kosten kan antingen en konstant foderkoncentration (mg/kg foder eller ppm) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt (mg/kg kroppsvikt), beräknad på veckobasis, användas. Det alternativ som används ska anges.
32. När det gäller oral administrering doseras djuren dagligen med testkemikalien (sju dagar i veckan) under en period på 12 månader (kronisk fas) eller 24 månader (karcinogenicitetsfas), se också punkterna 33 och 34. Alla andra doseringsscheman t.ex. fem dagar per vecka måste motiveras. När det gäller dermal administrering, behandlas djuren normalt med testkemikalien minst 6 timmar per dag, 7 dagar per vecka, enligt kapitel B.9 i denna bilaga (11), under en period av 12 månader (kronisk fas) eller 24 månader (karcinogenicitetsfas). Exponering genom inhalation utförs 6 timmar per dag, 7 dagar per vecka, men exponering 5 dagar per vecka kan också användas om detta är motiverat. Exponeringsperioden är normalt 12 månader (kronisk fas) eller 24 månader (karcinogenicitetsfas). Om andra gnagare än råttor utsätts för enbart nos, kan de maximala exponeringstiderna justeras för att minska artspecifikt lidande. En motivering bör ges när man använder en exponeringstid kortare än 6 timmar per dag. Se också kapitel B.8 i denna bilaga (9).
33. När en testkemikalie administreras via sondmatning bör detta ske via en magsond eller en lämplig intubationskanyl vid ungefär samma tid varje dag. Normalt administreras en singeldos en gång per dag, men om en kemikalie är lokalt irriterande är det möjligt att upprätthålla den dagliga dosen genom delad dos (två gånger per dag). Den största mängd vätska som kan administreras vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör vara så liten som möjligt, och bör normalt inte överstiga 1 ml/100 g kroppsvikt för gnagare (31). Variationer i testvolym bör minimeras genom justering av koncentrationen för att säkerställa en konstant volym vid alla dosnivåer. Potentiellt frätande eller irriterande kemikalier är undantagna, och måste spädas ut för att allvarliga lokala verkningar ska kunna undvikas. Testning vid koncentrationer som sannolikt är frätande eller irriterande för magtarmkanalen bör undvikas.

Studiens varaktighet

34. Doseringsperioden och varaktigheten för den kroniska fasen i den här studien är i allmänhet 12 månader, även om studiens utformning medger och kan tillämpas på antingen kortare (t.ex. 6 eller 9 månader) eller längre (t.ex. 18 eller 24 månader) varaktighetsstudier, beroende på kraven från särskilda regelverk eller särskilda mekanistiska ändamål. Avvikelser från en exponeringstid på 12 månader bör motiveras, särskilt när det gäller kortare varaktigheter. Alla dosgrupper som tilldelats denna fas kommer att avslutas vid den utsatta tidpunkten för utvärdering av kronisk toxicitet och icke-neoplastisk patologi. Satellitgrupper som ingår för att övervaka reversibiliteten av eventuella toxikologiska förändringar som orsakats av den testkemikalie som undersöks, ska bibehållas utan dosering under en period som inte är kortare än 4 veckor och inte längre än en tredjedel av den totala studieperioden efter avslutad exponering.
35. Studiens varaktighet för den karcinogenicitetsfasen av studien är normalt 24 månader för gnagare, vilket motsvarar huvuddelen av livslängden för de djur som används. Kortare eller längre varaktigheter kan användas, beroende på livslängden för djurarten i studien, men bör motiveras. För specifika stammar av möss t.ex. AKR/J-, C3H/J- eller C57BL/6J-stammar kan en varaktighet på 18 månader vara mer lämplig. Det följande ger viss

vägledning om varaktighet, studiens upphörande och överlevnad, ytterligare vägledning, inbegripet en bedömning av huruvida en negativ karcinogenicitetsstudie i förhållande till överlevnad är godtagbar, finns i vägledningsdokument nr 116 (7).

- Studiens upphörande bör beaktas när antalet överlevare i de lägre dosgrupperna understiger 25 procent.
- I de fall där endast högdosgruppen dör i förtid på grund av toxicitet bör detta inte leda till upphörande av studien.
- Överlevnad för vardera kön ska beaktas för sig.
- Studien bör inte fortsätta över den punkt där tillgängliga data från studien inte längre är tillräckliga för att ge en statistisk giltig utvärdering.

OBSERVATIONER (KRONISK TOXICITETSFAK)

36. Samtliga djur bör observeras beträffande sjuklighet eller mortalitet, vanligtvis i början och slutet av varje dag, inklusive helger och helgdagar. Allmänna kliniska observationer bör göras minst en gång per dag, helst vid samma tidpunkt(er), och ta hänsyn till maximalt förväntade effekter efter doseringen när det gäller administrering via sondmatning.
37. Detaljerade kliniska observationer bör göras på samtliga djur minst en gång före den första exponeringen (för jämförelser inom samma objekt), i slutet av studiens första vecka och därefter varje månad. Observationsprotokollet bör anordnas så att variationerna mellan enskilda observatörer minimeras och är oberoende av testgrupp. Dessa observationer bör göras utanför buren på avsedd plats, ungefär vid samma tidpunkter varje gång. De bör noggrant registreras, helst med hjälp av ett poängsystem som utförligt definierats av testlaboratoriet. Ansträngningar bör göras för att säkerställa att variationer i observationsbetingelserna är minimala. Observationerna bör omfatta, men inte begränsas till, förändringar av hud, päls, ögon, slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (t.ex. tårflöde, upprest härrem, pupillstorlek, ovanligt andningsmönster). Förändringar i gång, hållning och reaktion på hantering liksom eventuella krampor eller spasmer, stereotypier (t.ex. överdrivet putsande, repetitivt cirklande) eller bisarrt beteende (t.ex. självstypning, baklängsgång) bör också registreras (32).
38. En oftalmologisk undersökning med ett oftalmoskop eller annan lämplig utrustning bör utföras på samtliga djur före den första administreringen av testkemikalien. Vid slutet av studien bör denna undersökning helst utföras på samtliga djur, men åtminstone på högdos- och kontrollgrupperna. Om behandlingsrelaterade ögonförändringar upptäcks bör samtliga djur undersökas. Om strukturell analys eller annan information tyder på okulär toxicitet bör frekvensen på okulära undersökningar höjas.
39. För kemikalier där tidigare 28-dagars och/eller 90-dagars toxicitetstest med upprepad dosering indikerade en potential för att framkalla neurotoxiska effekter, bör sensorisk reaktion på stimuli av olika slag (32) (t.ex. hörsel, syn och djupsensorisk stimuli) (33), (34), (35), bedömning av greppstyrka (36) och bedömning av motorisk aktivitet (37) eventuellt utföras före studiestarten och i 3-månadersperioder efter studiestarten till och med 12 månader, samt vid studiens upphörande (om längre än 12 månader). Ytterligare uppgifter om de procedurer som kan följas finns i respektive hänvisningar. Dock kan andra procedurer än de som hänvisats till också användas.
40. För kemikalier där tidigare 28-dagars och/eller 90-dagars toxicitetstester med upprepad dosering indikerade en potential för att orsaka immunologiska effekter, kan ytterligare undersökningar av denna endpoint eventuellt utföras vid avslutningen.

Kroppsvikt, foder-/vattenkonsumtion och fodereffektivitet

41. Samtliga djur bör vägas vid behandlingens början, minst en gång i veckan de första 13 veckorna och därefter minst en gång per månad. Mätningar av foderkonsumtion och fodereffektivitet bör minst göras varje vecka de 13 första veckorna och därefter minst en gång per månad. Vattenkonsumtionen bör mätas minst en gång per vecka de 13 första veckorna, och därefter minst en gång per månad, när testkemikalien administreras via dricksvattnet. Mätningar av vattenkonsumtionen bör också övervägas för studier där vattendrickandet förändras.

Hematologi och klinisk biokemi

42. I studier med gnagare bör hematologiska undersökningar utföras på samtliga djur (10 handjur och 10 hondjur per grupp), vid 3, 6 och 12 månader, samt vid studiens upphörande (om längre än 12 månader). Satellitdjur kan behövas när det gäller möss för att genomföra alla nödvändiga hematologiska bestämningar (se punkt 19). För icke-gnagare måste prover tas från ett mindre antal djur (t.ex. 4 djur per kön och per grupp för hundstudier) vid mellanliggande provtagningsstillfällen och avslutandet enligt vad som beskrivits för gnagare. Mätningar vid 3 månader, antingen på gnagare eller icke-gnagare, behöver inte utföras om inga effekter syntes på hematologiska parametrar i en tidigare 90-dagars studie som genomfördes med jämförbara dosnivåer. Blodprover bör tas under narkos från angivet ställe, till exempel genom hjärtpunktering eller från retro-orbitalsinus.
43. Följande lista över parametrar bör undersökas (38): Total- och differentialräkning av vita blodkroppar, erytrocytantal, trombocytantal, hemoglobinkoncentration, hematokrit (packad cellvolym), medelvärde för korpuskulärvolym (MCV), medelvärde för korpuskulärt hemoglobin (MCH), medelvärde för korpuskulär hemoglobinkoncentration (MCHC), protrombintid och aktiverad partiell tromboplastintid. Övriga hematologiska parametrar såsom Heinz-kroppar eller annan atypisk erythrocytmorfologi eller methemoglobin kan mätas på lämpligt sätt beroende på testkemikalens toxicitet. Sammantaget bör en flexibel strategi antas, beroende på den observerade och/eller förväntade verkningen av en given testkemikalie. Om testkemikalien har en effekt på det hematopoetiska systemet, kan retikulocytantal och benmärgscytologi också anges, men detta behöver inte utföras rutinmässigt.
44. Kliniska biokemiska bestämningar för att undersöka större toxiska effekter i vävnader och, särskilt, effekter på lever och njurar bör utföras på blodprov från samtliga försöksdjur (10 handjur och 10 hondjur per grupp), vid samma tidsintervaller som specificerades för de hematologiska undersökningarna. Satellitdjur kan behövas när det gäller möss för att genomföra alla nödvändiga kliniska biokemiska bestämningar. För icke-gnagare måste prover tas från ett mindre antal djur (t.ex. 4 djur per kön och per grupp för hundstudier) vid mellanliggande provtagningsstillfällen och avslutandet enligt vad som beskrivits för gnagare. Mätningar vid 3 månader, antingen på gnagare eller icke-gnagare, behöver inte utföras om inga effekter syntes på kliniska biokemiska parametrar i en tidigare 90-dagars studie som genomfördes med jämförbara dosnivåer. Det rekommenderas att djuren fastar över natten (med undantag av möss) före blodprovstagningen⁽¹⁾. Följande lista över parametrar bör undersökas (38): Glukos, urea (ureakväve), kreatinin, totalprotein, albumin, kalcium, natrium, kalium, totalkolesterol, minst två lämpliga tester för hepatocellular utvärdering (alaninaminotransferas, aspartaminotransferas, glutamatdehydrogenas, totala gallsyror) (39), och minst två lämpliga tester för hepatobiliär utvärdering (alkaliskt fosfat, gammaglutamyl transferas, 5'-nukleotidas, totalt bilirubin, totala gallsyror) (39). Andra kliniska kemiska parametrar såsom triglycerider vid fasta, specifika hormoner och kolinesteras kan mätas på lämpligt sätt, beroende på testkemikalens toxicitet. Sammantaget finns det ett behov av en flexibel strategi, beroende på den observerade och/eller förväntade verkningen av en given testkemikalie.
45. Urinanalyserna bör utföras på samtliga försöksdjur (10 handjur och 10 hondjur per grupp), på prov som tagits vid samma intervaller som för hematologi och klinisk kemi. Mätningar vid 3 månader behöver inte utföras om ingen effekt syntes på urinanalysen i en tidigare 90-dagars studie som genomfördes med jämförbara dosnivåer. Följande lista över parametrar ingick i en sakkunnig rekommendation om kliniska patologiska studier (38): Utseende, volym, osmolalitet eller specifik vikt, pH, totalprotein och glukos. Andra bestämningar inkluderar keton, urobilinogen, bilirubin och ockult blödning. Ytterligare parametrar kan användas vid behov för att utvidga undersökningen av observerad(e) verkning(ar).
46. Det anses allmänt att utgångsvärden för hematologiska och kliniska kemiska variabler behöver bestämmas före behandlingen i hundstudier, men inte behöver bestämmas för studier i gnagare (38). Om historiska basdata (se punkt 58) är otillräckliga bör man överväga att generera sådana data.

PATOLOGI

Obduktion

47. Samtliga djur i studien bör normalt underkastas en fullständig obduktion, som omfattar omsorgsfull granskning av kroppens yttre ytor, alla kroppsöppningar samt kranium, bröst- och bukhåla samt deras innehåll. En bestämelse kan också göras (i avlivnings- eller satellitgrupperna) så att mätningarna begränsas till vissa viktiga åtgärder, såsom neurotoxicitet eller immunotoxicitet (se punkt 21). Dessa djur behöver inte obduceras och efterföljande procedurer beskrivs i nedanstående punkter. Obduktion kan från fall till fall krävas av indikator-djur, efter beslut av försöksledaren.

⁽¹⁾ För ett antal mätningar i serum och plasma, särskilt glukos, är det önskvärt med fasta över natten. Den största orsaken till detta är att den ökade variationen som oundvikligen resulterar från icke-fastande, tenderar att maskera mer subtila effekter och göra tolkningen svår. Dock bör det noteras att fastande över natten kan påverka djurens allmänna metabolism, särskilt beträffande utfodringsstudier, och kan störa den dagliga exponeringen av testkemikalien. Samtliga djur bör bedömas i samma fysiologiska tillstånd och därför bör detaljerade eller neurologiska bedömningar planeras för annan dag än den kliniska biokemiska provtagningen.

48. Organvikter bör samlas från samtliga djur, förutom de som undantas genom den senare delen av punkt 47. Binjuror, hjärna, bitestiklar, hjärta, njurar, lever, äggstockar, mjälte, testiklar, sköldkörtel (vägda efter fixering, med bisköldkörtlar) och livmoder från samtliga djur (bortsett från de döende och/eller avlivade) putsas från angränsande vävnad, i förekommande fall, och deras vätvikt bestäms så snart som möjligt efter dissektionen för att undvika uttorkning.
49. Följande vävnader bör bevaras i det mest lämpade fixeringsmedlet för både vävnadstypen och den planerade efterföljande histopatologiska undersökningen (40) (vävnader inom hakparenteser är valfria):

alla större skador	hjärta	pankreas	mage (förmagen, glandulärmagen)
binjure	ileum	bisköldkörtel	[tänder]
aorta	jejunum	perifer nerv	testikel
hjärna (inklusive delar av cerebrum, cerebellum och medulla/pons)	njure	hypofys	tymus
cekum	tårkörtel (exorbital)	prostata	sköldkörtel
cervix	lever	rektum	[tungor]
koagulerande körtel	lunga	spottkörtel	trakea
kolon	lymfkörtlar (både ytliga och djupa)	sädesblåsa	urinblåsa
tolvfingertarm	bröstkörtel (obligatorisk för honor, och om synlig och dissekeringsbar hos hanar)	skelettmuskel	uterus (inklusive cervix)
bitestikel	[övre luftvägarna, inklusive nos, turbinates och bihålorna]	hud	[uretra]
öga (inklusive näthinna)	esofagus	ryggmärg (på tre nivåer: cervikal, mitt på bröstkorgen och ländryggen)	[uretra]
[lårben med led]	[luktblub]	mjälte	vagina
gallblåsa (för andra arter än råtta)	äggstock	[bröstben],	snitt av ryggmärgen och/eller ett färskt benmärgs-aspirat
Harderiankörtel			

När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen bevaras. Kliniska och andra fynd kan indikera behovet av att undersöka ytterligare vävnader. Också alla organ som sannolikt är målorgan, baserat på kunskap om testkemikaliers egenskaper, ska konserveras. I studier som inbegriper administrering via huden bör listan på organ som anges för oralt intag undersökas, och det är nödvändigt med särskild provtagning och bevarande av huden där appliceringen har skett. I inhalationsstudier bör förteckningen över bevarade och undersökta vävnader från luftvägarna följa rekommendationerna i kapitel B.8 (9) och kapitel B.29 i denna bilaga (10). För andra organ/vävnader (och i tillägg till de specifikt bevarade vävnaderna från luftvägarna) bör de organ som finns i förteckningen som anges för den orala vägen undersökas.

Histopatologi

50. Vägledning finns tillgänglig om bästa praxis vid genomförande av studier gällande toxikologisk patologi (40). Den minsta histopatologiska undersökningen bör vara:

— Alla vävnader från högdos- och kontrollgrupperna.

- Alla vävnader från djur som dör eller avlivas under studien.
- Alla vävnader som uppvisar makroskopiska abnormaliteter.
- Målvävnader, eller vävnader som uppvisade behandlingsrelaterade förändringar i högdosgruppen, från samtliga djur i alla andra doseringsgrupper,
- När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen undersökas.

OBSERVATIONER (KARCINOGENICITETSFAS)

51. Samtliga djur bör observeras beträffande sjuklighet eller mortalitet, vanligtvis i början och slutet av varje dag, inklusive helger och helgdagar. Djuren bör dessutom kontrolleras en gång per dag för särskilda tecken med toxikologisk relevans. När det gäller sondmatningsstudier bör djuren kontrolleras under perioden omedelbart efter dosering. Särskild uppmärksamhet bör ges åt tumörutveckling och tidpunkten för tumörens uppkomst, plats, mått, utseende, och utvecklingen av varje tydlig eller kännbar tumör ska registreras.
52. Samtliga djur bör vägas vid behandlingens början, minst en gång i veckan de första 13 veckorna och därefter minst en gång per månad. Mätningar av foderkonsumtion och fodereffektivitet bör minst göras varje vecka de 13 första veckorna och därefter minst en gång per månad. Vattenkonsumtionen bör mätas minst en gång per vecka de 13 första veckorna, och därefter minst en gång per månad, när testkemikalien administreras via dricksvattnet. Mätningar av vattenkonsumtionen bör också övervägas för studier där vattendrickandet förändras.

Hematologiska, kliniska biokemiska och andra mätningar

53. För att maximera informationen som erhållits från studien, särskilt överväganden gällande verkningssätt, kan blodprover tas för hematologi och klinisk biokemi, även om detta avgörs av försöksledaren. Urinanalys kan även vara lämplig. Data om djuren som används i studiens kroniska toxicitetsfas, vanligtvis efter en 12-månaders varaktighet (punkt 34) ger information om dessa parametrar. Ytterligare vägledning om värdet med att ta sådana prov som en del av en karcinogenicitetsstudie finns i vägledningsdokument nr 116 (7). Om blodprov tas så bör dessa samlas i slutet av testperioden, strax före eller som ett led i avlivningsförfarandet. De bör tas under narkos från angivet ställe, till exempel genom hjärtpunktering eller från retro-orbitalsinus. Blodutstryk kan också beredas för undersökning, särskilt om benmärgen verkar vara målorganet, även om värdet av en sådan undersökning av blodutstryk i karcinogenicitetsfasen för bestämning av karcinogen/onkogen potential har ifrågasatts (38).

PATOLOGI

Obduktion

54. Samtliga djur i studien med undantag av kontrolldjur och andra satellitgrupper (se punkt 20), ska underkastas en fullständig obduktion som omfattar omsorgsfull granskning av kroppens yttre ytor, alla kroppsöppningar samt kranium, bröst- och bukhåla samt deras innehåll. Obduktion kan från fall till fall krävas av indikatordjur och andra satellitdjur efter beslut av försöksledaren. Organvikter är normalt inte en del av en karcinogen studie, eftersom geriatriska förändringar och, i senare skeden, utvecklingen av tumörer förvirrar användbarheten av organviktsdata. De kan dock vara avgörande för att göra en sammanvägd bedömning, och särskilt för överväganden beträffande verkningssätt. Om de är en del av en satellitstudie bör de inte samlas in senare än ett år efter studiens inledning.
55. Följande vävnader bör bevaras i det mest lämpade fixeringsmedlet för både vävnadstypen och den planerade efterföljande histopatologiska undersökningen (40) (vävnader inom hakparenteser är valfria):

alla större skador	hjärta	pankreas	mage (förmagen, glandulärmagen)
binjure	ileum	bisköldkörtel	[tänder]
aorta	jejunum	perifer nerv	testikel
hjärna (inklusive delar av cerebrum, cerebellum och medulla/pons)	njure	hypofys	tymus
cekum	tårkörtel (exorbital)	prostata	sköldkörtel

cervix	lever	rektum	[tunga]
koagulerande körtel	lunga	spottkörtel	trakea
kolon	lymfkörtlar (både ytliga och djupa)	sädesblåsa	urinblåsa
tolvfingerarm	bröstkörtel (obligatorisk för honor, och om synlig och dissekeringsbar hos hanar)	skelettmuskel	uterus (inklusive cervix)
bitestikel	[övre luftvägarna, inklusive nos, turbinates och bihålorna]	hud	[ureter]
öga (inklusive näthinna)	esofagus	ryggmärg (på tre nivåer: cervikal, mitt på bröstkorgen och ländryggen)	[uretra]
[lårben med led]	[luktbulb]	mjälte	vagina
gallblåsa (för andra arter än råtta)	äggstock	[bröstben],	snitt av ryggmärgen och/eller ett färskt benmärgs-aspirat
Harderiankörtel			

När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen bevaras. Kliniska och andra fynd kan indikera behovet av att undersöka ytterligare vävnader. Alla organ som sannolikt är målorgan, baserat på kunskap om testkemikaliers egenskaper, ska också konserveras. I studier som inbegriper administrering via huden bör listan på organ som anges för oralt intag undersökas, och det är nödvändigt med särskild provtagning och bevarande av huden där appliceringen har skett. I inhalationsstudier bör förteckningen över bevarade och undersökta vävnader från luftvägarna följa rekommendationerna i kapitel B.8 (8) och kapitel B.29 i denna bilaga (9). För andra organ/vävnader (och i tillägg till de specifikt bevarade vävnaderna från luftvägarna) bör de organ som finns i förteckningen som anges för den orala vägen undersökas.

Histopatologi

56. Vägledning finns tillgänglig om bästa praxis vid genomförande av studier gällande toxikologisk patologi (40). De vävnader som minst ska undersökas är:

- Alla vävnader från högdos- och kontrollgrupperna.
- Alla vävnader från djur som dör eller avlivas under studien.
- Alla vävnader som uppvisar makroskopiska abnormaliteter, inklusive tumörer.
- När behandlingsrelaterade histopatologiska förändringar observeras i högdosgruppen, ska samma vävnader från samtliga djur i alla andra dosgrupper undersökas,
- När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen undersökas.

DATA OCH RAPPORTERING (KARCINOGENICITET OCH KRONISK TOXICITET)

Data

57. Individuella data för samtliga utvärderade parametrar bör ges. Därutöver bör alla data sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antal djur vid testets början, antal djur som påfanns döda under testet eller som avlivats av humanitära skäl och tidpunkten för dödsfallen eller avlivningen, antal djur som visar tecken på toxicitet, en beskrivning av de tecken på toxicitet som observerats, inklusive tidpunkt för de första tecknen, varaktighet och hur allvarliga de toxiska verkningarna är, antal djur som uppvisar skador, typ av skador och procentandelen djur för varje typ av skada. Sammanfattande tabeller bör ge medelvärden och standardavvikelser (för kontinuerliga testdata) för djur som uppvisar toxiska effekter eller skador, i tillägg till skadornas gradering.

58. Historiska kontrolldata kan vara värdefulla vid tolkningen av studiens resultat, t.ex. i de fall då det finns indikationer på att de data som lämnats från de parallella kontrollerna i huvudsak avviker jämfört med aktuell data från kontroldjuren från samma testanläggning/-koloni. Historiska kontrolldata, om de har utvärderats, bör lämnas in från samma laboratorium och relatera till djur i samma ålder och av samma stam som genererats under de fem år som föregick studien i fråga.
59. När det är tillämpligt bör numeriska resultat utvärderas genom en lämplig och allmänt vedertagen statistisk metod. Vid utformningen av studien bör de statistiska metoderna och datan som ska analyseras väljas (punkt 9). Valet bör innehålla bestämmelser om överlevnadsjusteringar, där så krävs.
60. Testrapporten ska omfatta följande information:

Testkemikalie:

- Fysikalisk natur, renhet och fysikalisk-kemiska egenskaper.
- Identifikationsuppgifter.
- Kemikalien källa.
- Satsnummer.
- Intyg om kemisk analys.

Vehikel (i förekommande fall):

- Motivering för val av vehikel (om annan än vatten).

Försöksdjur:

- Art/stam som används och motivering av valet.
- Djurens antal, ålder och kön vid testets början.
- Ursprung, inhysning, kost etc.
- Djurens individuella vikt vid testets början.

Försöksbetingelser:

- Grund för administreringsätt och dosval.
- I förekommande fall, de statistiska metoderna som använts för att analysera datan.
- Uppgifter om testkemikalien sammansättning/foderberedning.
- Analysdata om beredningens uppnådda koncentration, stabilitet och homogenitet.
- Administreringsätt och uppgifter om testkemikalien administrering.
- Om enbart nos eller helkropp vid inhalationsstudier.
- Faktiska doser (mg/kg kroppsvikt/dag) och omräkningsfaktor för kostens/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (mg/kg eller ppm) till den faktiska dosen, om tillämpligt.
- Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

Resultat (sammanfattande data i tabellform och enskilda djurdata ska presenteras):

Allmänt

- Överlevnadsdata.
- Kroppsvikt/kroppsviktsförändringar.
- Foderförbrukning, beräkningar av fodereffektivitet, om det har utförts, och vattenförbrukning, om tillämpligt.
- Toxikokinetiska data, i förekommande fall.
- Oftalmoskopi (om tillgängligt).
- Hematologi (om tillgängligt).
- Klinisk kemi (om tillgängligt).

Kliniska fynd

- Tecken på toxicitet.
- Förekomst (och allvarlighetsgrad) av eventuell abnormitet.
- Art, allvarlighetsgrad och varaktighet för kliniska observationer (huruvida de är övergående eller permanenta).

Obduktionsdata

- Terminal kroppsvikt.
- Organvikter och deras förhållanden, om tillämpligt.
- Obduktionsfynd, abnormaliteternas förekomst och allvarlighetsgrad.

Histopatologi

- Icke-neoplastiska histopatologiska fynd.
- Neoplastiska histopatologiska fynd.
- Sambandet mellan grova och mikroskopiska fynd.
- Detaljerad beskrivning av alla behandlingsrelaterade histopatologiska fynd, inklusive allvarlighetsgradering.
- Rapport över eventuell inbördes granskning av bilder.

Statistisk bearbetning av resultaten, när så är lämpligt

Diskussion av resultaten, inklusive:

- Diskussion om eventuella modellstrategier.
- Dos:responsförhållanden.
- Historiska kontrolldata.

— Beaktande av eventuell information om verkningssätt.

— BMD-, NOAEL- eller LOAEL-bestämning.

— Relevans för människor.

Slutsatser

LITTERATUR

- (1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.
- (3) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.
- (4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 14–191.
- (5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.
- (6) Kapitel B.27 i denna bilaga, test avseende subkronisk oral toxicitet (90 dagars upprepat oraltest på icke-nagare).
- (7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, tillgänglig på OECD:s offentliga webbplats för vägledningar för tester på www.oecd.org/env/testguidelines.
- (8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (9) Kapitel B.8 i denna bilaga, subakut inhalationstoxicitet: 28-dagars studie.
- (10) Kapitel B.29 i denna bilaga, subkronisk inhalationstoxicitet: 90-dagars studie.
- (11) Kapitel B.9 i denna bilaga, toxicitet vid upprepad dosering (28 dagar, dermalt).
- (12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793–801.
- (13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581–589.
- (14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51–56.
- (15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591–653.
- (16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al. (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1–7.

- (17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 9–35.
- (18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 37–68.
- (19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 69–98.
- (20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
- (21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729–837.
- (23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1):214.
- (25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. s. 279–284.
- (26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect* 105:1196–1203.
- (27) Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål, EUT L 276, 20.10.2010, s. 33–79.
- (28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.
- (29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.
- (30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology*, 21:15–23.
- (32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (33) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999–1003.

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

Tillägg 1

DEFINITION

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.”

(7) Kapitel B.36 ska ersättas med följande:

”B.36 TOXIKOKINETIK

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s TG 417 (2010). Studier som undersöker toxikokinetik (TK) i en testkemikalie utförs för att erhålla relevant information om dess absorption, distribution, biotransformering (dvs. metabolism) och exkretion, som hjälp för att relatera koncentration eller dos till den observerade toxiciteten, och för att underlätta förståelsen av dess toxicitetsmekanism. TK kan hjälpa till med att förstå de toxikologiska studierna genom att visa att försöksdjuren systematiskt exponeras för testkemikalien och genom att visa vilka som är de cirkulerande delarna (ursprunglig kemikal/metaboliter). Grundläggande TK-parametrar som bestämts genom dessa studier ger också information om risken för ackumulering av testkemikalien i vävnader och/eller organ och potentialen för framkallande av biotransformering som en följd av exponeringen av testkemikalien.
2. TK-data kan bidra till bedömningen av lämpligheten och relevansen av djurtoxicitetsdata för extrapolering av fara för människor och/eller riskbedömning. Dessutom kan toxikokinetiska studier ge användbar information för bestämning av dosnivåer för toxicitetsstudier (linjär kontra icke-linjär kinetik), administreringsåttverknningar, biotillgänglighet och frågor som rör studieutformning. Vissa typer av TK-data kan användas i fysiologiskt baserad toxikokinetisk (PBTK) modellutveckling.
3. Det finns viktiga användningsområden för metabolit/TK-data såsom föreslagen möjlig toxicitet och verkningsått och deras relation till dosnivå och exponeringsått. Dessutom kan metabolismdata ge användbar information för bedömning av den toxikologiska betydelsen av exponeringar till exogent frambringade metaboliter av testkemikalien.
4. Adekvat toxikokinetisk data är till hjälp för att stödja den fortsatta acceptansen och tillämpligheten av kvantitativa struktur-aktivitetssamband, jämförelse med strukturlika ämnen eller grupperingsstrategier i säkerhetsbedömningen av kemikalier. Kinetiska data kan också användas för att utvärdera den toxikologiska relevansen av andra studier (t.ex. in vivo/in vitro).
5. Om inget annat administreringsått nämns (se särskilt punkterna 74–78) tillämpas denna testmetod på oral tillförsel av testkemikalien.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

6. Regelsystem har olika krav och behov vad gäller mätning av endpoints och parametrar relaterade till toxikokinetik för olika klasser av kemikalier (t.ex. bekämpningsmedel, biocider, industrikemikalier). Till skillnad från de flesta testmetoder beskriver denna testmetod toxikokinetisk testning, vilket omfattar ett flertal mätningar och endpoints. I framtiden kan flera nya testmetoder och/eller vägledningsdokument utvecklas för att beskriva varje endpoint enskilt och mer detaljerat. När det gäller denna testmetod, vars tester eller bedömningar specificeras av kraven och/eller behoven för varje regelsystem.
7. Det finns många studier som kan utföras för att utvärdera TK-beteendet hos en testkemikalie för regulatoriska ändamål. Dock är, beroende på särskilda regulatoriska behov eller situationer, inte alla dessa möjliga studier nödvändiga för utvärderingen av en testkemikalie. Flexibilitet, med hänsyn till den undersökta testkemikalies egenskaper, behövs vid utformningen av toxikokinetiska studier. I några fall kanske bara vissa frågor behöver utforskas för att ta itu med de testkemikalierelaterade faro- och riskfrågorna. I några sammanhang kan TK-data samlas som en del av utvärderingen i andra toxikologiska studier. I andra sammanhang kan ytterligare och/eller mer omfattande TK-studier vara nödvändiga beroende på behovet av regler och/eller om nya frågor uppstår som en del av testkemikalies utvärdering.
8. All tillgänglig information om testkemikalien och relevanta metaboliter och analoger bör beaktas av laboratoriet innan studien genomförs i syfte att höja studiekvaliteten och undvika onödig djuranvändning. Detta kan omfatta data från andra relevanta testmetoder (in vivo-studier, in vitro-studier, och/eller in silico-utvärderingar). Fysikalisk-kemiska egenskaper, såsom en kemikalies fördelningskoefficient i oktanol-vatten (uttryckt som log

P_{OW}), pKa, vattenlöslighet, ångtryck och molekylvikt kan vara användbara för planering av en studie och tolkning av resultat. De kan fastställas med lämpliga metoder som beskrivs i de relevanta testmetoderna.

BEGRÄNSNINGAR

9. Denna testmetod är inte utformad för att hantera särskilda omständigheter, såsom dräktigt eller diande djur och avkomma, eller för att utvärdera potentiella resthalter i exponerade livsmedelproducerande djur. Däremot kan datan som erhålls från en B.36-studie ge bakgrundsinformation som en vägledning vid utformning av specifika studier för dessa undersökningar. Den här testmetoden är inte avsedd för testning av nanomaterial. En rapport om preliminär översyn av OECD:s testriktlinjer för deras tillämplighet för nanomaterial visar att TG 417 (motsvarande denna testmetod B.36) inte kan tillämpas på nanomaterial (1).

DEFINITIONER

10. Definitioner som används för tillämpningen av denna testmetod finns i tillägget.

DJURSKYDDSÖVERVÄGANDEN

11. Vägledning om human behandling av djur finns i OECD:s vägledningsdokument (GD) 19 (2). Det rekommenderas att OECD:s GD 19 konsulteras för alla in vivo- och in vitro-studier beskrivna i denna testmetod.

BESKRIVNING AV METODER

Pilotstudier

12. Användning av pilotstudier rekommenderas och uppmuntras vid valet av försöksparametrar till toxikokinetiska studier (t.ex. metabolism, massbalans, analysförfaranden, dosfinnande, utandning av CO₂, etc.). Karakteriseringen av vissa av dessa parametrar kräver inte användningen av radioaktivt märkta kemikalier.

Val av djur

Arter

13. De djurarter (och den stam) som används för TK-testning bör helst vara densamma som användes i andra toxikologiska studier utförda med testkemikalien av intresse. Normalt bör råttor användas då den har använts i stor utsträckning för toxikologiska studier. Användningen av andra eller ytterligare arter kan vara befogat om viktiga toxikologiska studier visar prov på signifikant toxicitet i dessa arter eller om deras toxicitet/toxikokinetik visar sig vara mer relevant för människor. Motivering bör ges för val av djurart och dess stam.
14. Om inte annat anges avser denna testmetod råttan som försöksart. Vissa aspekter för metoden kan behöva modifieras vid användningen av andra försöksarter.

Ålder och stam

15. Unga friska vuxna djur (normalt 6–12 veckor vid tidpunkten för doseringen) bör användas (se också punkterna 13 och 14). Motivering bör ges för användningen av djur som inte är unga vuxna. Alla djur bör vara i samma ålder i början av studien. Viktskillnaden mellan enskilda djur bör inte överstiga $\pm 20\%$ av medelvikten för testgruppen. Helst bör den stam som används vara samma som användes för härledning av den toxikologiska databasen för testkemikalien.

Djurens antal och kön

16. Minst fyra djur av samma kön bör användas för varje dos som testas. Motivering bör ges för könet på de djur som används. Användningen av båda könen (fyra hanar och fyra honor) bör övervägas om det finns belegg för betydande könsrelaterade skillnader i toxicitet.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

17. Djuren bör i regel inhysas individuellt under testperioden. Inhysning i grupp kan vara berättigad under särskilda omständigheter. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. Temperaturen i försöksdjurens utrymme bör vara 22 °C (± 3 °C) och den relativa fuktigheten 30–70 %. För utfodringen kan konventionellt laboriefoder användas med ett obegränsat utbud av dricksvatten.

Testkemikalie

18. En radioaktivt märkt testkemikalie med ^{14}C kan användas för alla massbalans- och metabolitidentifieringsaspekter av studien, men om det kan påvisas att:

- Massbalans och metabolitidentifiering kan utvärderas tillräckligt med den omärkta testkemikalien.
- Den analytiska specificiteten och sensitiviteten för metoden som används med en icke-radioaktiv testkemikalie är lika med eller större än det som kan uppnås med den radioaktivt märkta testkemikalien.

Då behöver man inte använda en radioaktivt märkt testkemikalie. Vidare kan andra radioaktiva och stabila isotoper användas, särskilt om ämnet svarar för eller är en del av testkemikaliens toxiska del. Om möjligt bör den radioaktiva märkningen lokaliseras i en kärndel av molekylens som är metaboliskt stabil (den är inte utbytbar, avlägsnas inte metaboliskt som CO_2 och blir inte del av en-kolreserven i organismen). Märkning av flera platser eller specifika områden i molekylens kan vara nödvändig för att se vad som händer med testkemikaliens metabolism.

19. De radioaktivt märkta och omärkta testkemikalierna bör analyseras med lämpliga metoder för att upprätta renhet och identitet. Den radioaktiva renheten hos den radioaktiva testkemikalien bör vara den högst uppnåbara för en viss testkemikalie (helst mer än 95 %) och rimlig ansträngning bör göras för att identifiera föroreningar som förekommer i 2 % eller mer. Renheten tillsammans med identiteten och andelen eventuella orenheter som har identifierats bör rapporteras. Enskilda reglerande program kan välja att ge ytterligare vägledning som hjälp för definitionen och specifikationerna av testkemikalier som består av blandningar för bestämning av renhet.

Val av dos

Pilotstudie

20. Vanligtvis är en enkel oral dos tillräcklig för pilotstudien. Dosen bör vara icke-toxisk, men tillräckligt hög för att medge metabolisk identifiering i exkret (och plasma om tillämpligt) samt uppfylla det fastställda syftet med pilotstudien som nämns i punkt 12 i denna testmetod.

Huvudstudier

21. För huvudstudierna är minst två doser att föredra eftersom samlad information från minst två dosgrupper kan vara behjälplig för dosinställning i andra toxicitetsstudier, och hjälpa till med dosrespons-bedömningen av redan tillgängliga toxicitetstester.
22. Om två doser administreras bör båda doserna vara tillräckligt höga för att medge metabolisk identifiering i exkrement (och plasma om tillämpligt). Information från tillgängliga toxicitetsdata bör beaktas vid valet av dos. Om informationen inte är tillgänglig (t.ex. från akuta orala toxicitetsstudier med registrerade tecken på toxicitet eller från toxicitetsstudier med upprepade dosering) kan ett värde för den högre dosen som ligger under LD_{50} - (oralt och via huden) eller LC_{50} -uppskattningen (inhalation), eller under det lägre värdet för akut toxicitetsintervall beaktas. Den lägre dosen bör vara en del av den högre dosen.
23. Om endast en dosnivå undersöks bör helst dosen vara tillräckligt hög för att medge metabolitidentifiering i exkrement (och plasma om tillämpligt), utan att framkalla uppenbar toxicitet. En motivering bör ges till varför inte en andra dosnivå har inkluderats.
24. Om doseffekten på de kinetiska processerna behöver upprättas kanske två doser inte räcker och minst en dos behöver vara tillräckligt hög för att mätta dessa processer. Om arean under plasmakoncentration-tidkurvan (AYC) inte är linjär mellan två dosnivåer som används i huvudstudien, är detta ett tydligt tecken på att mättnad av en eller flera kinetiska processer sker någonstans mellan de två dosnivåerna.
25. För testkemikalier med låg toxicitet bör en maximal dos på 1 000 mg/kg kroppsvikt (oralt och via huden) användas (om administreringen sker via inhalation, se kapitel B.2 i denna bilaga för vägledning; vanligtvis överskrider inte denna dos 2 mg/l). Kemisk-specifika överväganden kan kräva en högre dos beroende på regleringsbehoven. Valet av dos ska alltid motiveras.

26. Engångsdostoxikokinetiska data och vävnadsdistributionsdata kan vara lämpliga för att fastställa potentialen för ackumulering och/eller persistens. I vissa fall kan dock administrering med upprepad dos behövas i) för att mer fullständigt hantera potentialen för ackumulering och/eller persistens eller förändringar i TK (t.ex. enzyminduktion och inhibition), eller ii) vad som krävs enligt tillämpliga regelsystem. I studier med upprepad dosering där administrering med upprepade låga doser vanligtvis räcker, kan under vissa omständigheter också vara nödvändiga (se även punkt 57).

Administrering av testkemikalie

27. Testkemikalien ska upplösas eller suspenderas homogent i samma vehikel som används i andra toxicitetsstudier med oral sondmatning som utförs med testkemikalien, om sådan vehikelinformation finns tillgänglig. Grunden för valet av vehikel ska ges. Valet av vehikel och doseringsvolymen ska beaktas vid studiens utformning. Det sedvanliga administreringssättet är genom sondmatning, dock kan administrering via gelatinkapsel eller foderblandning vara fördelaktig i specifika situationer (i båda fallen bör detta motiveras). Verifiering av den faktiska dos som administreras till varje djur bör ges.
28. Den maximala volymen vätska som ska administreras genom sondmatning vid ett tillfälle beror på försöksdjurens storlek, typen av dosvehikel, och huruvida fodret undanhålls eller ej före administreringen av testkemikalien. Motivering för administrering eller undanhållande av foder före dosering ska ges. I regel bör volymen hållas så låg som möjligt för antingen vattenbaserade eller icke-vattenbaserade vehiklar. Dosvolymen bör normalt inte överskrida 10 ml/kg kroppsvikt för gnagare. Vehikelvolymen som används för mer lipofila testkemikalier kan börja med 4 ml/kg kroppsvikt. Vid upprepad dosering, när dagligt fastandet kontraindiceras, bör lägre dosnivåer (t.ex. 2–4 ml/kg kroppsvikt) övervägas. Där så är möjligt kan man överväga att använda en dosvolym som överensstämmer med den som administrerats i andra sondmatningsstudier av en testkemikalie.
29. Intravenös (IV) administrering av testkemikalien och mätning av testkemikalien i blod och/eller exkrement kan användas för att fastställa biotillgänglighet eller relativ oral absorption. För IV-studien administreras en engångsdos (vanligtvis lika med men inte överskridande den lägre orala dosen – se val av dos) av testkemikalien med en lämplig vehikel. Detta ämne bör administreras i lämplig volym (t.ex. 1 ml/kg kroppsvikt) på den valda platsen för administreringen till minst fyra djur av lämpligt kön (båda könen kan användas om det är befogat, se punkt 16). En fullt upplöst eller suspenderad dosberedning är nödvändig för IV-administrering av testkemikalien. Vehikeln för IV-administrering ska inte störa blodintegriteten eller blodflödet. Om testkemikalien infunderas bör infusionshastigheten rapporteras och standardiseras mellan djuren, förutsatt att en infusionspump används. Narkos bör användas om man för in en kanyl i halsvenen (för administrering av testkemikalie och/eller insamling av blod) eller om man använder den femorala artären för administreringen. Hänsyn bör tas till den typ av bedövning som kan påverka toxikokinetiken. Djuren bör få tillfälle att återhämta sig före administreringen av testkemikalien plus vehikeln.
30. Andra administreringssätt, såsom hud och inhalation (se punkterna 74–78), kan vara tillämpliga för vissa testkemikalier med tanke på deras fysikalisk-kemiska egenskaper och den förväntade mänskliga användningen eller exponeringen.

Mätningar

Massbalans

31. Massbalans bestäms genom summering av procenten för den administrerade (radioaktiva) dosen som utsöndrats i urin, avföring och utandningsluft, och procentandelen som finns i vävnader, resterna av kroppen och burtvätt (se punkt 46). Generellt anses en total återvinning av den administrerade testkemikalien (radioaktivitet) i storleksordningen > 90 % vara tillräcklig.

Absorption

32. En initial uppskattning av absorption kan uppnås genom att utesluta den procentuella dosen i det gastrointestinala (GI) området och/eller avföringen från massbalansbestämningen. För procentberäkningen av absorption, se punkt 33. För undersökning av avföring, se punkterna 44–49. Om den exakta omfattningen av absorption efter oral dosering inte kan fastställas genom massbalansstudier (t.ex. där mer än 20 % av den administrerade dosen finns i avföringen) kan ytterligare undersökningar vara nödvändiga. Dessa studier kan antingen omfatta 1) oral administrering av testkemikalie och mätning av testkemikalie i galla eller 2) oral och intravenös administrering av testkemikalien och mätning av nettotestkemikalie i urin plus utandningsluft plus kadaver för var och en av de båda sätten. I båda studieutformningarna genomförs mätning av radioaktivitet som en surrogatmetod för kemikaliespecifik analys av testkemikalien plus metaboliter.
33. Om en gallutsöndringsstudie genomförs används vanligtvis oral administrering. I denna studie bör kanyler föras in i gallgångarna hos minst fyra djur av lämpligt kön (eller av båda könen om det är befogat) och en engångsdos av testkemikalien ska administreras. Efter administreringen av testkemikalien bör utsöndringen av radioaktivitet/testkemikalie i gallan övervakas så länge som krävs för att uppskatta procentandelen av den administrerade dosen som utsöndras via denna väg, som kan användas för att direkt beräkna omfattningen av oral absorption enligt följande:

Procentandel absorption = (mängd i galla + urin + utandningsluft + kropp utan matspjälkningskanalinhåll)/
administrerad mängd × 100

34. I några klasser av testkemikalien kan direkt utsöndring av den absorberade dosen uppträda i de intestinala membranerna. I sådana fall anses inte mätningen av %-dosen i avföringen efter en oral dos i gallgången representativt för den icke-absorberade dosen. Det rekommenderas att då tarmsekretion tros ske baseras den absorberade %-dosen på absorptionen beräknad på utsöndringen efter den orala jämfört med den intravenösa (hel eller gallgång) (se punkt 35). Det rekommenderas också att om kvantifiering av tarmsekretet anses nödvändig, mäts exkretionen i gallgången efter den intravenösa administreringen.

Biotillgänglighet

35. Biotillgänglighet kan bestämmas genom plasma-/blodkinetik på de orala och intravenösa grupperna, såsom beskrivs i punkterna 50–52, genom särskilda kemiska analyser av testkemikalien och/eller relevant metabolit(er), därför krävs inte testkemikalier märkta med radioaktivitet. Beräkningen av testkemikaliens biotillgänglighet (F) eller relevant metabolit(er) kan utföras enligt följande:

$$F = (AUC_{\text{exp}}/AUC_{\text{IV}}) \times (D_{\text{osIV}}/D_{\text{osexp}})$$

Där AUC är arean under plasmakoncentration-tidkurvan, och exp är den experimentella vägen (oral, dermal eller via inhalation).

36. Vid riskbedömning av systematiska effekter, föredras i allmänhet biotillgänglighet framför procentuell absorption när man jämför systematiska koncentrationer i djurstudier med analoga bioövervakningsdata från studier över arbetstagares exponering. Situationen kan bli mer komplicerad om doserna är i det icke-linjära området så det är viktigt att toxikokinetisk screening bestämmer doserna i det linjära området.

Vävnadsfördelning

37. Kunskap om en testkemikalies vävnadsfördelning och/eller dess metaboliter är viktig för identifieringen av målvävnader och förståelsen för de underliggande mekanismerna för toxicitet, samt information om testkemikalies potential och metabolitackumulering och persistens. Procentandelen av den totala (radioaktiva) dosen i vävnader samt rester i kroppen är det som minst som ska mätas vid exkretionsförsökets upphörande (t.ex. upp till 7 dagar efter dosering eller mindre beroende på testkemikalies specifika beteende). När ingen testkemikalie detekteras i vävnaderna vid studiens upphörande (t.ex. för att testkemikalien kanske har eliminerats före studiens upphörande på grund av en kort halveringstid), bör man vara försiktig för att undvika feltolkning av datan. I denna typ av situation bör vävnadsfördelningen undersökas vid tidpunkten för testkemikalies (och/eller metabolit) plasma-/blodtoppkoncentration (T_{max}) eller topphastighet för urinexkretion, när så är lämpligt (se punkt 38). Vidare kan vävnadsinsamlingar vid ytterligare tidpunkter vara nödvändiga för att bestämma vävnadsfördelningen av testkemikalien och/eller dess metaboliter, bedöma tidsberoendet (om tillämpligt), underlätta upprättande av massbalansen och/eller det som krävs av en behörig myndighet. Vävnader som bör samlas in är lever, fett, magtarmkanalen, njurar, mjälte, helblod, rester av kroppen, målvävnadsorgan och eventuellt andra vävnader (t.ex. sköldkörtel, erythrocyter, reproduktionsorgan, hud, öga (särskilt i pigmenterade djur) som har en potentiell betydelse för den toxikologiska utvärderingen av testkemikalien. Analys av ytterligare vävnader vid samma tidpunkter bör beaktas för att maximera utnyttjandet av djuren och i händelse av att målorgantoxicitet observeras i subkroniska eller kroniska toxicitetsstudier. Den (radioaktiva) restkoncentrationen och förhållandet vävnad-blod bör också rapporteras.
38. Utvärderingen av vävnadsfördelningen vid ytterligare tidpunkter såsom tidpunkten för plasma-/blodtoppkoncentrationen (t.ex. T_{max}) eller urinexkretionens topphastighet, kan också behövas eller krävas av en behörig myndighet. Denna information kan underlätta förståelsen av toxicitet samt testkemikalies potential och metabolitackumulering och persistens. Motivering för urvalet bör ges; prover för analys bör i allmänhet vara desamma som de ovan (se punkt 37).
39. Kvantifiering av radioaktivitet i vävnadsfördelningsstudier kan utföras med organdissektion, homogenisering, förbränning och/eller löslighet, följt av vätskescintillationsräkning (LSC) av fångade rester. Vissa tekniker, för närvarande på olika utvecklingsstadiet t.ex. kvantitativ helkroppsauroradiografi och receptormikroskopisk autoradiografi, kan vara användbara för att bestämma fördelningen av en testkemikalie i organ och/eller vävnader (3) (4).
40. För exponeringsvägar annat än orala, bör specifika vävnader samlas in och analyseras, såsom lungor i inhalationsstudier och hud i dermal studier. Se punkterna 74–78.

Metabolism

41. Exkret (och plasma, i förekommande fall) bör samlas in för identifiering och kvantifiering av oförändrad testkemikalie och metaboliter som beskrivs i punkterna 44–49. Det är acceptabelt med sammanslagning av urin och avföring för att underlätta metabolitidentifiering inom en given dosgrupp. Profiler av metaboliter från varje tidsperiod rekommenderas. Om bristen på prov och/eller radioaktivitet utesluter detta, är det dock acceptabelt med sammanslagning av urin och avföring över flera tidpunkter, men sammanslagning mellan könen eller doser är inte acceptabelt. Lämpliga kvalitativa och kvantitativa metoder ska användas för att analysera urin, avföring, sönderfallen radioaktivitet från behandlade djur samt galla vid behov.
42. Rimliga ansträngningar bör göras för att identifiera alla metaboliter som finns i 5 % eller mer av den administrerade dosen och för att tillhandha ett metaboliskt system för testkemikalien. Testkemikalier som kännetecknas av exkrementer som innefattar 5 % eller mer av den administrerade dosen bör identifieras. Identifiering hänvisar till den exakta strukturella bestämningen av komponenter. Normalt utförs identifiering antingen genom co-kromatografi av metaboliten med kända standarder som använder två olika system eller tekniker för positiv strukturell identifiering, såsom masspektrometri, kärnmagnetisk resonans (NMR) etc. När det gäller co-kromatografi anses inte kromatografiska tekniker som använder samma stationära fas med två olika lösningsmedelssystem vara en lämplig tvåmetodsverifiering av metabolitidentitet, eftersom metoderna inte är självständiga. Identifiering genom co-kromatografi ska erhållas genom användning av två olika analytiskt oberoende system såsom omvänd och normal tunnskikt-kromatografi (TLC) och vätskekromatografi (HPLC). Förutsatt att den kromatografiska separationen är av lämplig kvalitet är ytterligare bekräftelse genom spektroskopi inte nödvändig. Alternativt kan otvetydig identifiering även erhållas med metoder som ger strukturell information såsom vätskekromatografi/masspektrometri (LC-MS) eller vätskekromatografi/tandem-masspektrometri (LC-MS/MS), gaskromatografi/masspektrometri (GC-MS), och NMR-spektrometri.
43. Om det inte är möjligt med identifiering av metaboliter på 5 % eller mer av den administrerade dosen bör en motivering/förklaring lämnas i slutrapporten. Det kan vara lämpligt att identifiera metaboliter som utgör mindre än 5 % av den administrerade dosen för att få en bättre förståelse av metabolismen för faro- och/eller riskbedömning av testkemikalien. Strukturell bekräftelse ska lämnas när det är möjligt. Detta kan inkludera profilering av plasma eller blod, eller andra vävnader.

Exkretion

44. Hastigheten och omfattningen av exkretion av den administrerade dosen bör bestämmas genom mätning av procentandelen av den återvunna (radioaktiva) dosen från urin, avföring och utandningsluft. Dessa data hjälper också till att etablera massbalans. De kvantiteter av testkemikalien (radioaktivitet) som eliminerats i urin, avföring och utandningsluft bör bestämmas med lämpliga tidsintervall (se punkterna 47–49). Försök med upprepad dos ska utformas för att medge insamling av exkretionsdata för att uppfylla de mål som beskrivs i punkt 26. Detta kommer att möjliggöra jämförelse med försök med engångsdos.
45. Om en pilotstudie har visat att ingen signifikant mängd av testkemikalien (radioaktivitet) (enligt punkt 49) utsöndras i utandningsluften, då behöver inte utandningsluften samlas in i den slutgiltiga studien.
46. Varje djur ska placeras i en separat metabolisk enhet för uppsamling av urin och avföring (urin, avföring och utandningsluft). Vid slutet av varje uppsamlingsperiod (se punkterna 47–49), bör de metaboliska enheterna sköljas med lämpligt lösningsmedel (detta är känt som "burtvätt") för att säkerställa maximal återvinning av testkemikalien (radioaktivitet). Insamling av urin och avföring bör upphöra efter 7 dagar, eller efter att minst 90 % av den administrerade dosen har återvunnits, beroende på vilket som inträffar först.
47. De totala mängderna av testkemikalien (radioaktivitet) i urin ska bestämmas vid minst två olika tidpunkter under dag 1 av uppsamlingen, varav en 24 timmar efter dosering, och därefter dagligen till dess studien upphör. Valet av mer än två provtagningstidpunkter under dag ett (t.ex. vid 6, 12 och 24 timmar) uppmuntras. Resultaten från pilotstudier ska analyseras för information om alternativa eller kompletterande tidpunkter för insamling. En motivering ska ges för insamlingsschemana.
48. Den totala mängden testkemikalie (radioaktivitet) i avföring ska fastställas på daglig basis med början 24 timmar efter dosering tills studien avslutas, såvida inte pilotstudier föreslår alternativa eller kompletterande tidpunkter för insamling. En motivering ska ges för de alternativa insamlingsschemana.
49. Insamlingen av passerad CO₂ och andra flyktiga material kan avbrytas i ett givet studieförsök när mindre än 1 % av den administrerade dosen återfinns i utandningsluften under en 24-timmars uppsamlingsperiod.

Tidpunktsstudier

Plasma-/blodkinetik

50. Syftet med dessa studier är att få en uppskattning av grundläggande TK-parametrar (t.ex. C_{max} , T_{max} , halveringstid ($t_{1/2}$), AUC) för testkemikalien. Dessa studier kan utföras med en dos eller, mer troligt med två eller fler doser. Dosinställning bör bestämmas av försökstypen och/eller frågan som behandlas. Kinetiska data kan behövas för att lösa frågor såsom testkemikalens biotillgänglighet och/eller för att klargöra doseffekten för godkännande (t.ex. för att klargöra huruvida godkännandet är mättat på ett dosberoende sätt).
51. För dessa studier ska minst fyra djur av samma kön per dosgrupp användas. Motivering bör ges för könet på de djur som används. Användningen av båda könen (fyra hanar och fyra honor) bör övervägas om det finns belägg för betydande könsrelaterade skillnader i toxicitet.
52. Efter administreringen av testkemikalien (radioaktiv) ska blodprov tas från varje djur vid lämpliga tidpunkter med hjälp av lämplig provtagningsmetod. Volymen och antal blodprov som kan erhållas per djur kan begränsas genom potentiella effekter från upprepad provtagning på djurhälsa/fysiologi och/eller analysmetodens känslighet. Proven ska analyseras för varje enskilt djur. I vissa fall (t.ex. metabolitkaraktärisering) kan det vara nödvändigt att samla in prover från fler än ett djur. Samlingsprover bör identifieras och en förklaring för sammanslagning bör ges. Om en radioaktiv märkt testkemikalie används kan en analys av den totala aktuella radioaktiviteten vara tillräcklig. Om så är fallet, bör den totala radioaktiviteten analyseras i helblod och plasma eller plasma och röda blodkroppar för möjliggöra en beräkning av blod-/plasmaförhållandet. Under andra omständigheter kan mer specifika undersökningar som kräver identifiering av moderssubstans och/eller metaboliter, eller bedömning av proteinbindning behövas.

Övrig vävnadskinetik

53. Syftet med dessa studier är att få information om tidsförloppet för att behandla frågor rörande toxisk verkningsmekanism, bioackumulering och biopersistens genom bestämning av testkemikalienivåer i olika vävnader. Valet av vävnader och antal tidpunkter som utvärderas beror på frågan som ska behandlas och testkemikalens toxikologiska databas. Utformningen av dessa ytterligare vävnadskinetiska studier bör ta hänsyn till den information som samlats in som beskrivs i punkterna 37–40. Dessa studier kan gälla engångsdosering eller upprepad dosering. En detaljerad motivering för den använda strategin ska ges.
54. Skäl för att utföra andra vävnadskinetiska studier kan omfatta:
 - Tecken på utökad blodhalveringstid tyder på möjlig ackumulering av testkemikalien i olika vävnader eller
 - intresse av om en stabil tillståndsnivå har uppnåtts i vissa vävnader (även om en stabil tillståndsnivå av en testkemikalie kan ha uppnåtts kan det finnas intresse av att veta att en stabil tillståndsnivå också har uppnåtts i målvävnader i t.ex. studier med upprepad dosering).
55. För dessa typer av tidsförloppsstudier bör en lämplig oral dos av testkemikalien administreras till minst fyra djur per dos per tidpunkt och tidsförloppet för distributionen övervakas i utvalda vävnader. Endast ena könet får användas om inte könsspecifik toxicitet observeras. Om total radioaktivitet eller moderkemikalien och/eller metaboliter analyseras beror på den fråga som behandlas. Bedömning av vävnadsdistributionen bör göras med lämpliga metoder.

Enzyminduktion/inhibition

56. Studier som tar upp eventuella effekter av enzyminduktion/inhibition eller biotransformation av testkemikalien som studeras kan krävas i ett eller flera av följande fall:
 - 1) Tillgängliga uppgifter tyder på ett samband mellan biotransformering av testkemikalien och ökad toxicitet.
 - 2) Tillgängliga toxicitetsdata tyder på ett icke-linjärt förhållande mellan dos och metabolism.
 - 3) Resultatet av metabolitidentifieringsstudier visar identifiering av en potentiell toxisk metabolit som kan ha producerats av en enzymväg som inducerats av testkemikalien.
 - 4) För att förklara effekter som antas vara kopplade till enzyminducerade fenomen.

5) Om toxikologiskt signifikanta förändringar i den metaboliska profilen hos testkemikalien observeras antingen *in vitro*- eller *in vivo*-försök med olika arter eller villkor, kan karakteriseringen av involverad enzym(er) behövas (t.ex. fas I-enzymen såsom isoenzymer av cytokrom P450-beroende mono-oxygenassystemet, fas II-enzymen såsom isoenzymer av sulfotransferas eller uridindifosfat glukuronosyltransferas, eller andra relevanta enzymer). Denna information kan användas för att utvärdera relevansen av art till art extrapoleringar.

57. Lämpliga studieprotokoll för att värdera testkemikalielaterade förändringar i TK, lämpligt validerade och motiverade bör användas. Exempelstudieutformning utgörs av upprepad dosering med omärkt testkemikalie, följt av en radioaktivt märkt engångsdos dag 14 eller upprepad dosering med radioaktivt märkt testkemikalie och provtagning dag 1, 7 och 14 för bestämning av metabolita profiler. Upprepad dosering med radioaktivt märkta kemikalier kan också ge information om bioackumulering (se punkt 26).

KOMPLETTERANDE METODER

58. Kompletterande metoder bortom *in vivo*-försök som beskrivs i denna testmetod kan ge nyttig information om absorption, distribution, metabolism eller eliminering av en testkemikalie i vissa arter.

Användning av *in vitro*-information

59. Flera frågor som rör metabolism av testkemikalien kan behandlas i *in vitro*-studier med lämpliga testsystem. Nyligen isolerade eller odlade hepatocyter och subcellulära fraktioner (t.ex. mikrosomer och cytosol eller S9-fraktioner) från levern kan användas för att studera eventuella metaboliter. Lokal metabolism i målorganet t.ex. lungan kan vara av intresse vid riskbedömningen. För dessa ändamål kan mikrosomala fraktioner av målorgan vara användbara. Studier med mikrosomer kan vara användbara för att hantera potentiella kön- och livsetappskillnader och karakterisera enzymparametrar (K_m och V_{max}) som kan hjälpa till vid bedömningen av dosberoende metabolism i förhållande till exponeringsnivåer. Dessutom kan mikrosomer vara användbara för att identifiera de specifika mikrosomala enzymer som är involverade i metabolismen av testkemikalien som kan vara relevanta i artextrapolering (se också punkt 56). Potentialen för induktion av metabolism kan också undersökas genom leversubcellulära fraktioner (t.ex. mikrosomer och cytosol) av djur som förbehandlats med testkemikalien i fråga, *in vitro* via hepatocytinduktionsstudier eller från specifika cellinjer som uttrycker relevanta enzymer. Under vissa omständigheter och under lämpliga förhållanden kan subcellulära fraktioner som kommer från mänskliga vävnader övervägas för bestämning av potentiella artskillnader i biotransformation. Resultaten från *in vitro*-undersökningar kan också vara användbara i utvecklingen av PBTK-modeller (5).

60. *In vitro*-hudabsorptionsstudier kan också ge kompletterande information för att karakterisera absorption (6).

61. Primära cellkulturer från leverceller och färskt vävnadsskivor kan användas för att behandla liknande frågor som med levermikrosomer. I vissa fall kan det vara möjligt att svara på specifika frågor med hjälp av cellinjer med definierade uttryck av det relevanta enzymet eller modifierade cellinjer. I vissa fall kan det vara användbart att studera inhiberingen och induktionen av specifika cytokrom P450-isozymer (t.ex. CYP1A1, 2E1, 1A2 och andra) och/eller fas II-enzymen av modersubstansen med hjälp av *in vitro*-studier. Informationen som erhålls kan användas för liknande strukturerade föreningar.

Användning av toxikokinetiska data från toxicitetsstudier som kompletterande information

62. Analys av blod, vävnad och/eller avföringsprover som erhållits under genomförandet av eventuella andra toxicitetsstudier kan ge data om biotillgänglighet, förändringar i plasmakoncentration i tid (AUC, C_{max}), bioackumuleringspotential, nedbrytningshastighet och köns- eller livsskedesförändringar i metabolism och kinetik.

63. Övervägande av studiens utformning kan användas för att besvara frågor som rör mättad absorption, biotransformering eller utsöndringsvägar vid högre dosnivåer, hanteringen av nya metaboliska vägar vid högre doser och begränsningen av toxiska metaboliter för högre doser.

64. Andra farobedömningsöverväganden kan omfatta frågor såsom:

— Åldersrelaterad känslighet på grund av skillnader i statusen för blod-hjärnbarriären, njuren och/eller avgiftningsskapaciteten.

— Subpopulationskänslighet på grund av skillnader i biotransformeringskapacitet eller andra TK-skillnader.

— Omfattningen av exponeringen av fostret genom transplacental överföring av kemikalier eller hos de nyfödda genom digivning.

Användning av toxikokinetisk modellering

65. Toxikokinetiska modeller kan vara användbara för olika faro- och riskbedömningsaspekter som till exempel förutsägelsen av systematisk exponering och intern vävnadsdos. Vidare kan specifika frågor om verkningsmekanism behandlas, och dessa modeller kan ge en grund för extrapolering mellan arter, exponeringsvägar, doseringsmönster och mänsklig riskbedömning. Data som är användbara för utvecklandet av PBTK-modeller för en testkemikalie för en given art inkluderar 1) fördelningskoefficienter, 2) biokemiska konstanter och fysiologiska parametrar, 3) vägspecifika absorptionsparametrar och 4) in vivo-kinetiska data för modellutvärdering (t.ex. nedbrytningsparametrar för relevanta (> 10 %) utsöndringsvägar, K_m och V_{max} för metabolism). Försöksdatan som används vid modellutvecklingen ska genereras med vetenskapligt sunda metoder och modellresultaten ska valideras. Testkemikalie och artspecifika parametrar såsom absorptionshastighet, blodvävnadspartitionering och metaboliska hastighetskonstanter bestäms ofta för att underlätta utvecklingen av oberoende eller fysiologiskt baserade modeller (7).

DATA OCH RAPPORTERING

66. Det rekommenderas att studierapporten innehåller en innehållsförteckning.

Rapportens huvuddel

67. Rapportens huvuddel ska innehålla information som omfattas av denna testmetod indelad i avsnitt och punkter enligt följande:

Sammanfattning

68. Denna del av studien ska innehålla en sammanfattning av studiens utformning och en beskrivning av metoderna som använts. Den bör också belysa de viktigaste resultaten avseende massbalans, arten och omfattningen av metaboliter, vävnadsrester, nedbrytningshastighet, bioackumuleringspotential, könsskillnader etc. Sammanfattningen bör presenteras i tillräcklig detalj för att möjliggöra en bedömning av resultaten.

Inledning

69. Denna del av rapporten ska omfatta studiens mål, motiv och utformning såväl som lämpliga referenser och eventuell bakgrundshistoria.

Material och metoder

70. Denna del av rapporten ska innehålla detaljerade beskrivningar av all relevant information, inklusive:

a) Testkemikalie

Denna underavdelning ska innehålla identifiering av testkemikalien: Kemiskt namn, molekylstruktur, kvalitativ och kvantitativ bestämning av dess kemiska sammansättning, kemisk renhet och när det så möjligt, typ och mängd av eventuella orenheter. Den bör också innehålla information om fysikalisk/kemiska egenskaper, inklusive fysiskt tillstånd, färg, bruttolöslighet och/eller fördelningskoefficient, stabilitet, och om så är lämpligt, frätande egenskaper. Om tillämpligt ska information om isomerer lämnas. Om testämnet är radioaktivt bör information om följande ingå i denna underavdelning: Typen av radionuklid, läge för märkning, specifik aktivitet och radiokemisk renhet.

Typ eller beskrivning av eventuell vehikel, spädningsmedel, suspenderingsmedel och emulgeringsmedel eller andra material som används vid administreringen av testkemikalien bör anges.

b) Försöksdjur

Denna underavdelning ska innehålla information om försöksdjuren, inklusive val och motivering av art, stam, ålder vid studiens inledning, kön samt kroppsvikt, hälsotillstånd och djurhållning.

c) Metoder

Denna underavdelning ska innehålla detaljer om studiens utformning och metod som används. Den ska innehålla en beskrivning av:

- 1) Motivering för varje ändring av exponeringsväg och exponeringsförhållanden, om tillämpligt.

- 2) Motivering för valet av dosnivåer.
 - 3) Beskrivning av pilotstudier som används i den experimentella utformningen av uppföljningsstudier, om tillämpligt. Pilotstudiens underlag ska lämnas in.
 - 4) Hur doseringslösningen bereddes och typen av lösningsmedel eller vehikel, om någon, som används.
 - 5) Antal behandlingsgrupper och antal djur per grupp.
 - 6) Doseringsnivåer och volym (och specifik dosaktivitet då radioaktivitet används).
 - 7) Väg och metod för administrering.
 - 8) Doseringsfrekvens.
 - 9) Fasteperiod (om sådan används).
 - 10) Total radioaktivitet per djur.
 - 11) Djurhantering.
 - 12) Provtagning och hantering.
 - 13) Analysmetoder som används för separering, kvantifiering och identifiering av metaboliter.
 - 14) Detektionsgräns för de använda metoderna.
 - 15) Andra experimentella mätningar och förfaranden som används (inklusive validering av metoder för metabolitanalys).
- d) Statistisk analys.

Om statistisk analys används för att analysera studieresultaten ska tillräcklig information om analysmetoden och de datorprogram som används ingå, så att en oberoende granskare/statistiker kan omvärdera och rekonstruera analysen.

När det gäller systemmodellstudier såsom PBTK bör presentationen av modellerna innehålla en fullständig beskrivning av modellen för att tillåta en oberoende rekonstruktion och validering av modellen (se punkt 65 och Tillägg: Definitioner).

Resultat

71. All data ska sammanfattas i tabellform med lämplig statistisk utvärdering och beskrivas i texten i denna avdelning. Radioaktivitetsdata ska sammanfattas och presenteras på lämpligt sätt för studien, vanligtvis i mikrogram- eller milligramkvivalenter per massa för provet, även om andra enheter kan användas. Denna avdelning bör innehålla grafiska illustrationer, reproduktion av representativa kromatografiska och spektrometriska data, metabolitidentifiering/kvantifiering och föreslagna metaboliska vägar inklusive metaboliternas molekylstruktur. Vidare ska följande information ingå i denna avdelning, om tillämpligt:

- 1) Kvantitet och procentandel av återvinning i urin, avföring, utandningsluft, samt urin och avföring i burtvätt.
 - För dermala studier ska även data inkluderas beträffande återvinning av testkemikalien från behandlad hud, hudtvätt och kvarvarande radioaktivitet i huden vilket omfattar utrustning och metabolisk enhet samt resultaten från hudtvättsstudien. För fortsatt diskussion se punkterna 74–77.
 - Inhalationsstudier ska även innehålla data om återvinning av testkemikalien från lungor och nasala vävnader (8). För fortsatt diskussion se punkt 78.

- 2) Vävnadsfördelning rapporteras som procent av administrerad dos och koncentration (mikrogramekvivalenter per gram vävnad), och vävnad-blod eller vävnad-plasma-förhållanden.
- 3) Materialbalans utvecklad ur varje studie som inbegriper analys av kroppsvävnader och utsöndringar.
- 4) Plasmakoncentrationer och toxikokinetiska parametrar (biotillgänglighet, AUC, C_{max}, T_{max}, nedbrytning, halveringstid) efter administrering genom relevant väg(ar) för exponering.
- 5) Hastighet och omfattning av absorption av testkemikalien efter administrering genom relevant väg(ar) för exponering.
- 6) Mängden testkemikalie och metaboliter (rapporterad som en procentandel av den administrerade dosen) som uppsamlas från avföringen.
- 7) Hänvisning till tilläggsdata som innehåller individuella djurdata från alla kvantitativa endpoints (t.ex. dos-administrering, procentandel återvinning, koncentrationer, TK-parametrar etc.).
- 8) En figur med de föreslagna metaboliska vägarna och metaboliternas molekylära strukturer.

Diskussion och slutsatser

72. I detta avsnitt bör författaren/författarna:

- 1) Föreslå en metabolisk väg på grundval av resultaten från testkemikaliens metabolism och disposition.
- 2) Diskutera eventuella art- och könsskillnader när det gäller disposition och/eller biotransformering av testkemikalien.
- 3) Ställa upp i tabellform och diskutera identifieringen och omfattningen av metaboliter, nedbrytningshastighet, bioackumuleringspotential och nivå på moderämne i vävnadsrester och/eller metabolit(er) såväl som möjliga dosberoende förändringar i TK-parametrar, i förekommande fall.
- 4) I detta avsnitt integrera eventuella relevanta TK-data som erhållits i samband med genomförandet av toxicitetsstudier.
- 5) Ge en kortfattad slutsats som kan stödjas av resultaten från studien.
- 6) Tillagda avsnitt (som behövs eller är lämpliga).

73. Ytterligare avsnitt bör användas för att inkludera stöd för bibliografisk information, tabeller, figurer, tillägg etc.

ALTERNATIVA EXPONERINGSVÄGAR

Hud

Hudbehandling

74. Det här avsnittet innehåller specifik information om undersökningen av testkemikaliens toxikokinetik vid administrering via huden. För hudabsorption ska kapitel B.44 i denna bilaga (hudabsorption: in vivo-metod (9)) konsulteras. För andra endpoints såsom distribution och metabolism kan den här testmetoden B.36 användas. En eller flera dosnivåer för testkemikalien ska användas vid dermal behandling. Testkemikalien (t.ex. rent, utspätt eller berett material som innehåller testkemikalien vilken appliceras på huden) ska vara samma (eller ett realistiskt surrogat) som människor eller andra potentiella målarter kan exponeras för. Dosnivån(erna) ska väljas i enlighet med punkterna 20–26 i denna testmetod. Faktorer som kan tas i övervägande i dermalt dosval inkluderar förväntad mänsklig exponering och/eller doser vid vilka toxicitet observerades i andra dermala toxicitetsstudier. Den dermala dosen(erna) bör upplösas, om nödvändigt, i en lämplig vehikel och appliceras i en tillräcklig volym för att leverera de doserna. Strax före testet ska pälsen klippas på ryggsdelen på försöksdjurens bål. Rakning kan användas, men det bör göras cirka 24 timmar före testet. Vid klippning eller rakning av pälsen

ska försiktighet iakttas så att huden inte skadas, vilket kan ändra dess genomtränglighet. Cirka 10 % av kroppsytan bör göras ren för applicering av testkemikalien. Vid mycket toxiska kemikalier kan den yta som täcks vara mindre än 10 %, men en så stor del av området som möjligt ska täckas med en tunn och jämn film. Samma behandling av ytan ska användas för alla dermala testgrupper. De doserade områdena ska skyddas med lämpligt skydd som sitter på plats. Djuren bör inhysas separat.

75. En dermal tvättstudie bör genomföras för att bedöma mängden applicerad dos av testkemikalien som kan avlägsnas från huden genom tvättning av den behandlade huden med en mild tvål och vatten. Denna studie kan också ge stöd i upprättandet av massbalans när testkemikalien administreras via huden. För denna dermala tvättstudie bör en engångsdos av testkemikalien appliceras på två djur. Val av dosnivå är i enlighet med punkt 23 i denna testmetod (se även punkt 76 för diskussion om hudkontaktid). Mängderna av testkemikalien som återvunnits i tvättarna bör fastställas för att bedöma effektiviteten vid borttagningen av testkemikalien genom tvättproceduren.
76. Såvida den inte hindras av korrosionsverkan bör testkemikalien appliceras och hållas på huden i minst 6 timmar. Vid tidpunkten för borttagandet av skyddet bör det behandlade området tvättas enligt förfarandet i den dermala tvättstudien (se punkt 75). Både skyddet och tvättarna ska analyseras för kvarvarande testkemikalie. Vid studiens upphörande ska varje djur avlivas skonsamt i enlighet med (2) och den behandlade huden ska avlägsnas. En lämplig del av behandlad hud ska analyseras för att bestämma kvarvarande testkemikalie (radioaktivitet).
77. För toxikokinetisk bedömning av läkemedel kan olika förfaranden i enlighet med lämpligt regelverk behövas.

Inhalation

78. En engångskoncentration (eller mer vid behov) av testkemikalien bör användas. Koncentrationen(erna) ska väljas i enlighet med punkterna 20–26 i denna testmetod. Inhalationsbehandlingar ska utföras med hjälp av utrustning för "noskon" eller "enbart huvud" för att förhindra absorption genom alternativa vägar för exponering (8). Om andra villkor för inhalationsexponering används bör motiveringen för ändringen dokumenteras. Varaktigheten av exponering genom inhalation bör definieras, normalt är exponeringen 4–6 timmar.

LITTERATUR

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

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

Tillägg

DEFINITIONER

Absorption: Process(er) med upptag av kemikalier i eller genom vävnader. Absorption avser moderföreningen och alla dess metaboliter. Inte att förväxla med "biotillgänglighet".

Akkumulering (Bioakkumulering): Ökning av mängden testkemikalie över tid i vävnader (vanligtvis fettvävnader, efter upprepad dosering); om tillförseln av en testkemikalie i kroppen är större än den hastighet med vilken den elimineras, ackumulerar organismen testkemikalien och toxiska koncentrationer av testkemikalien kan uppnås.

ADME: Förkortning för absorption, distribution, metabolism och exkretion.

AUC: (arean under plasmakoncentration-tid-kurvan): Areal under kurvan i ett diagram för koncentrationen av testkemikalien i plasma över tiden. Den representerar den totala mängden testkemikalie som absorberas av kroppen inom en förutbestämd tidsperiod. Vid linjära förhållanden är AUC (från tiden noll till oändligheten) proportionell mot den totala mängden av en testkemikalie som absorberas av kroppen, oavsett graden av absorption.

Autoradiografi (helkroppsauroradiografi): Används för att avgöra kvalitativ och/eller kvantitativ vävnadslokalisering av en radioaktiv testkemikalie. Denna teknik använder röntgenfilm eller på senare tid digital fosforimaging för att visualisera radioaktivt märkta molekyler eller fragment av molekyler genom att registrera strålningen som emitteras i det objekt som studeras. Kvantitativ helkroppsauroradiografi kan, jämfört med organdissektion, ha vissa fördelar för utvärdering av testkemikaliers distribution och bedömningen av den totala återvinningen och upplösningen av radioaktivt material i vävnader. En betydande fördel är, till exempel, att den kan användas för en pigmenterad djurmodell för att utvärdera eventuell association av testkemikalien med melanin, som kan binda vissa molekyler. Medan det kan ge bekväma helkroppsoversikter av bindningsställen med hög kapacitet-låg affinitet, kan denna teknik dock vara begränsad i att känna igen specifika målställen såsom receptor-bindningsställen där relativ hög upplösning och hög känslighet behövs för detektering. När autoradiografi används bör försöket som syftar till att bestämma massbalansen för den administrerade föreningen utföras som en separat grupp eller i en separat studie från vävnadsfördelningsförsöket, där alla exkret (vilket även kan inkludera utandningsluft) och hela kroppen homogeniseras och analyseras genom vätskescintillationsräkning.

Galleexkretion: Exkretion via gallgångarna.

Bioakkumulering: Se "akkumulering".

Biotillgänglighet Fraktion av en administrerad dos som når det stora kretsloppet eller görs tillgänglig på platsen för fysiologisk aktivitet. Normalt refererar testkemikaliers biotillgänglighet till moderssubstanten, men skulle kunna hänvisa till dess metabolit. Den anses endast ha en kemisk form. *Observera:* Biotillgänglighet och absorption är inte detsamma. Skillnaden mellan t.ex. oral absorption (dvs. närvaron i tarmväggen och portal cirkulation) och biotillgänglighet (dvs. närvaron i systemblod och i vävnader) kan uppstå från kemisk nedbrytning på grund av metabolism i tarmväggen eller utflödestransport tillbaka till lumen i magsäcken eller presystemisk metabolism i levern, bland andra faktorer (10). Biotillgängligheten för den toxiska komponenten (moderssubstans eller en metabolit) är en kritisk parameter i riskbedömningen för människor (hög till lågdos-extrapolering, väg till extrapolering) för härledning av ett internt värde från externa NOAEL eller BMD (tillämpad dos). Det är den orala absorptionen som räcker för leverpåverkan vid oral administrering. Dock för varje påverkan annat än vid portalen för inträde, är det biotillgängligheten som i allmänhet är en mer pålitlig parameter för vidare användning i riskbedömningen, inte absorptionen.

Biopersistens: Se "persistens".

Biotransformation: (Vanligtvis enzymatisk) kemisk omvandling av testkemikalien av intresse, till en annan kemikalie i kroppen. Synonymt med metabolism.

C_{max}: Antingen maximal (toppvärde) koncentration i blodet (plasma/serum) efter administrering eller maximal (toppvärde) utsöndring (i urin eller avföring) efter administrering.

Nedbrytningshastighet: Kvantitativt mått på den hastighet vid vilken testkemikalien förs bort från blodet, plasman eller en viss vävnad per tidsenhet.

Kammare: Strukturell eller biokemisk del (eller enhet) av ett organ, vävnad eller cell, som är skild från resten.

Avgiftningsvägar: Serier av steg som leder till eliminering av toxiska kemikalier från kroppen, antingen genom metabolisk förändring eller exkretion.

Distribution: Spridning av en testkemikalie och dess derivat i en organism.

Enzymer/isozymer: Proteiner som katalyserar kemiska reaktioner. Isozymer är enzymer som katalyserar liknande kemiska reaktioner men skiljer sig i sin aminosyresekvens.

Enzymatiska parametrar: K_m : Michaelis konstant och V_{max} : maximal hastighet.

Exkretion: Process(er) genom vilken en administrerad testkemikalie och/eller dess metaboliter avlägsnas från kroppen.

Exogent: Införd från eller producerad utanför organismen eller systemet.

Extrapolering: Slutledning av en eller flera okända värden på grundval av det som är känt eller har observerats.

Halveringstid ($t_{1/2}$): Den tid det tar för koncentrationen av testkemikalien att minska med hälften i en kammare. Den refererar normalt till plasmakoncentrationen av testkemikalien i hela kroppen.

Induktion/enzyminduktion: Enzymsyntes som svar på en miljömässig stimulans eller en inducermolekyl.

Linjäritet/linjär kinetik: En process är linjär med avseende på kinetik när alla överföringshastigheter mellan kammare står i proportion till de mängder eller koncentrationer som är närvarande dvs. första ordningen. Följaktligen är nedbrytnings- och distributionsvolymerna konstanta såväl som halveringstiderna. De uppnådda koncentrationerna är proportionella med doseringshastigheten (exponering), och ackumuleringen är lättare förutsägbar. Linjäritet/icke-linjäritet kan bedömas genom att jämföra relevanta parametrar t.ex. AUC efter olika doser eller efter engångsexponering och upprepad exponering. Avsaknad av dosberoende kan vara tecken på mättnad av enzymer involverade i metabolismen i föreningen, en ökning av AUC efter upprepad exponering jämfört med engångsexponering kan vara tecken på inhibering av metabolismen, och en minskning av AUC kan vara en indikation på induktion av metabolismen (se även (11))

Massbalans: Redovisning av när testkemikalien inträder i och lämnar systemet.

Materialbalans: Se massbalans.

Toxicitetsmekanism (sätt)/verkningsmekanism (sätt): Verkningsmekanism avser specifika biokemiska interaktioner genom vilka en testkemikalie alstrar dess effekt. Verkningsätt hänvisar till mer allmänna vägar som leder till en testkemikalies toxicitet.

Metabolism: Synonymt med biotransformering.

Metaboliter: Produkter av metabolism eller metaboliska processer.

Oral absorption: Den procentuella andelen testkemikaliedos absorberad från administreringsstället (dvs. matspjälkningskanalen). Denna kritiska parameter kan användas för att förstå fraktionen av den administrerade testkemikalien som når portvenen och därefter levern.

Partialkoefficient: Även känd som fördelningskoefficienten som är ett mått på den differentiella lösligheten av en kemikalie i två lösningsmedel.

Toppblodnivåer (plasma/serum): Maximal (toppvärde) blodkoncentration (plasma/serum) efter administrering (se även " C_{max} ").

Persistens (biopersistens): Långsiktig närvaro av en kemikalie (i ett biologiskt system) på grund av resistens mot nedbrytning/eliminering.

Jämförelse: Endpointinformation för en eller flera kemikalier används för att göra en förutsägelse av endpointen för målkemikalien.

Receptormikroskopisk autoradiografi (eller receptor-mikroautoradiografi): Denna teknik kan användas för att sondera xenobiotisk interaktion med specifika vävnadsställen eller cellpopulationer såsom exempelvis för receptorbindning eller specifika verkningsstudsstudier som kan kräva hög upplösning och hög känslighet, vilket kanske inte är möjligt med andra tekniker såsom helkroppsauteuradiografi.

Administreringsväg (oral, intravenös, dermal, inhalation etc.): Avser de sätt vilka kemikalien administreras till kroppen (t.ex. oralt genom sondmatning, oralt genom foder, dermal, genom inhalation, intravenöst etc.).

Mättnad: Tillstånd där en eller flera av de kinetiska processerna (t.ex. absorption, metabolism eller nedbrytning) är vid ett maximum (läs "mättad").

Sensitivitet: Möjligheten för en metod eller instrument att diskriminera mellan mätningsresponser som representerar olika nivåer av en variabel av intresse.

Stationärt tillstånd för blodnivåer (plasma): Icke-jämviktstillstånd för ett öppet system där alla krafter som verkar på systemet exakt balanseras av motsatta krafter, på ett sådant sätt att alla dess komponenter är stationära i koncentrationen även om materia flödar genom systemet.

Systemmodellering (fysiologiskt baserad toxikokinetik, farmakokinetiskt baserad, fysiologiskt baserad farmakokinetisk, biologiskt baserad etc.): Abstrakt modell som använder matematiskt språk för att beskriva ett systems beteende.

Målvävnad: Vävnad i vilken en huvudsaklig skadlig effekt av ett gift manifesteras.

Testkemikalie: Alla kemikalier eller blandningar som testas med denna testmetod.

Vävnadsfördelning: Reversibel rörelse av en testkemikalie från en plats i kroppen till en annan. Vävnadsfördelning kan studeras genom organdissektion, homogenisering, förbränning och vätskescintillationsräkning eller genom kvalitativ och/eller kvantitativ helkroppsbildning. Den förstnämnda är användbar för att uppnå koncentration och procentandel av återvinning från vävnader och återstående kropp av samma djur, men kan sakna upplösning för alla vävnader och kan ha mindre än idealisk total återvinning (< 90 %). Se definition av den senare ovan.

T_{max}: Tid för att nå C_{max}.

Toxikokinetik (farmakokinetik): Studie av absorptionen, distributionen, metabolismen och exkretionen av kemikalier över tiden.

Validering av modeller: Processen för att bedöma lämpligheten av en modell för att konsekvent beskriva tillgängliga toxikokinetiska data. Modellerna kan utvärderas via statistisk och visuell jämförelse av modellprognoser med experimentella värden mot en gemensam oberoende variabel (t.ex. tid). Omfattningen av utvärderingen bör motiveras i förhållande till den avsedda användningen av modellen."

(8) Kapitel B.52 ska läggas till:

"B.52 AKUT INHALATIONSTOXICITET – AKUT TOXICITETSKLASS

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 436 (2009). Den första testriktlinjen för akut inhalation 403 antogs 1981, och har sedan dess reviderats (se kapitel B.2 i denna bilaga (1)). Utvecklingen av en inhalationsmetod för akut toxicitetsklass (ATC) (2) (3) (4) ansågs lämplig efter antagandet av den reviderade orala ATC-metoden (kapitel B.1 i denna bilaga) (5). En retrospektiv resultatbedömning av ATC-testmetoden för akut toxicitet vid inhalation visade att metoden är lämplig för klassificerings- och märkningsändamål (6). ATC-testmetoden för inhalation medger användningen av seriella steg med fasta målkoncentrationer för att rangordna en testkemikalies toxicitet. Dödlighet används som viktigaste endpoint, dock, bör djur med svår smärta och som lider, eller är döende avlivas skonsamt för att minska lidandet. Vägledning om humana endpoints finns i OECD:s vägledningsdokument nr 19 (7).
2. I vägledningsdokumentet om akut inhalationstoxicitet (GD 39) (8) kan man få vägledning om den här beskrivna testmetodens genomförande och tolkning.
3. Definitioner som används inom ramen för den här testmetoden finns i tillägg 1 och i GD 39 (8).
4. Testmetoden ger information om farliga egenskaper och låter testkemikalien rangordnas och klassificeras i enlighet med förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering av kemikalier som orsakar akut toxicitet (9). Om punktskattningar av LC50-värden eller koncentration-responsanalyser krävs, är kapitel B.2 i denna bilaga (1) den lämpligaste testmetoden. Ytterligare vägledning om val av testmetod finns i GD 39 (8). Den här testmetoden är inte specifikt avsedd för testning av specialmaterial såsom svårösliga isometriskt eller fibrösa material, eller avsiktligt tillverkade nanomaterial.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

5. Innan man överväger ett test i enlighet med den här testmetoden bör testlaboratoriet överväga all information avseende testkemikalien, inklusive befintliga studier vars data visar att man inte behöver göra fler tester, för att minska användningen av djur. Information som kan underlätta val av lämplig art, stam, kön, exponerings sätt och lämplig testkoncentration är ämnets identitet och kemiska struktur, fysikalisk-kemiska egenskaper, resultat från andra eventuella in vitro- eller in vivo-studier avseende toxicitet; förväntad(e) användning(ar) och risken för mänsklig exponering, tillgängliga (Q)SAR-data samt toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier. Koncentrationer som förväntas orsaka svår smärta eller lidande, beroende på frätande⁽¹⁾ eller allvarligt irriterande verkningar bör inte testas med denna testmetod (se GD 39 (8)).

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

6. Testprincipen bygger på ett stegvist förfarande som ger tillräcklig information om akut toxicitet vid inhalation av testkemikalien under en exponeringsperiod på 4 timmar för att möjliggöra dess klassificering. Andra exponeringstider kan gälla för specifika regulatoriska ändamål. För varje definierat koncentrationssteg ska 3 djur av vardera kön testas. Beroende på mortaliteten och/eller förekomsten av döende djur kan steg 2 vara tillräckligt för att möjliggöra bedömning av testkemikalies akuta toxicitet. Om det saknas belägg för att det ena könet är mer mottagligt än det andra kan testet fortsätta med det mer mottagliga könet. Resultatet från det föregående steget kommer att bestämma det följande steget så att
 - a) ingen ytterligare testning behövs,
 - b) testning görs av tre djur per kön, eller
 - c) testning görs av 6 djur av det mer mottagliga könet dvs. den undre gränsen för uppskattningar av toxisk klass som bör baseras på 6 djur per testkoncentrationsgrupp, oberoende av kön.
7. Döende djur eller djur som visar tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande ska avlivas skonsamt och medtas i tolkningen av testresultaten på samma sätt som de som avled under testet. Kriterier för att ta beslutet att avliva döende eller svårt lidande djur, och vägledning om hur man känner igen tecknen på förutsägbar eller annalkande död, omfattas i vägledningsdokument nr 19 om humana endpoints (7).

METODBESKRIVNING

Val av djurart

8. I testet används friska unga vuxna djur av stammar som vanligtvis används på laboratorier. För detta test används rätta och motiveringar ska ges om andra arter används.

Förberedelse av djuren

9. Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga. På exponeringsdagen bör djuren vara unga vuxna 8 till 12 veckor gamla och kroppsvikten bör ligga inom $\pm 20\%$ av medelvikten för vardera könet för eventuellt tidigare exponerade djur i samma ålder. Djuren väljs ut slumpmässigt, förses med märkning så att de kan identifieras individuellt. Därefter får djuren akklimatisera sig till laboratoriets betingelser i sina burar i minst fem dagar före teststarten. Djuren bör också akklimatisera sig till testutrustningen en kort period före testet, eftersom detta minskar den stress som en ny miljö innebär.

Djurhållning

10. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Den relativa fuktigheten bör ligga mellan 30 och 70 %, även om detta kanske inte är möjligt när vatten används som vehikel. Före och efter exponeringen bör djuren inhysas i grupper avhängigt kön och koncentration, dock får antalet djur per bur inte hindra en tydlig observation av varje enskilt djur, och förluster genom kannibalism och slagsmål bör minimeras. Om endast djurens nosar ska exponeras kan det vara nödvändigt att de får akklimatisera sig till fasthållningsrören. Fasthållningsrören ska inte medföra onödigt fysisk, termisk eller fasthållningsstress för djuren. Fasthållning kan påverka fysiologiska endpoints såsom kroppstemperatur (hypotermi) och/eller minimala respiratoriska volymer. Om det finns generiska data tillgängliga som inte pekar på sådana förändringar i någon nämnvärd omfattning är det inte nödvändigt med anpassningen till rören före exponeringen. Djur vars hela kroppar ska exponeras för en aerosol ska inhysas individuellt under exponeringen för att förhindra att de andra djuren i buren filtrerar aerosolen

⁽¹⁾ Korrosivetsbedömningen kan baseras på ett expertutlåtande på grundval av bevis såsom erfarenhet från människor eller djur, befintliga (in vitro) data, dvs. avsnitt B.40 (10), B.40 a (11) i denna bilaga eller OECD TG 435 (12), pH-värden, information från liknande kemikalier eller andra relevanta data.

genom sina påsar. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, utom under exponeringen, tillsammans med en obegränsad tillgång till vatten. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker.

Inhalationskammare

11. Vid val av inhalationskammare bör man beakta kemikalien beskaffenhet och testets ändamål. Det föredragna exponeringssättet är enbart nos (termen inkluderar även enbart huvud, enbart nos eller enbart tryne). Exponering av enbart nos föredras i allmänhet vid studier av vätskor och fasta aerosoler och ånga som kan kondenseras och bilda aerosoler. Vissa av undersökningens mål kan bättre uppnås genom exponering av hela kroppen, men detta ska motiveras i undersökningsrapporten. För att säkerställa atmosfärisk stabilitet vid användningen av en helkroppskammare ska den totala volymen av försöksdjuren inte överskrida 5 % av kammarens volym. Teknikerna för enbart nos och helkroppsexponeringen, deras principer och särskilda för- och nackdelar finns beskrivna i GD 39 (8).

EXPONERINGSBETINGELSER

Administrering av koncentrationer

12. En fast exponeringstid på 4 timmar, exklusive jämviktstid, rekommenderas. Andra varaktigheter kan behövas för att uppfylla specifika krav, dock bör motivering ges i studierapporten (se GD 39 (8)). Djur som exponeras i helkroppskammare ska inhysas individuellt för att hindra intagandet av testkemikalien på grund av skötsel av de andra djuren i buren. Inget foder ska ges under exponeringsperioden. Vatten kan tillhandahållas under en helkroppsexponering.
13. Djur exponeras för testkemikalien som en gas, ånga, aerosol eller en blandning av dem. Det fysikaliska tillstånd som ska testas beror på testkemikalien fysikalisk-kemiska egenskaper, vald koncentration och/eller dess mest sannolika fysikaliska form vid hanteringen och användningen. Hygroskopiska och kemiskt reaktiva testkemikalier ska testas i torr luft. Det är viktigt att se till att inga explosiva koncentrationer skapas.

Partikelstorleksfördelning

14. Partikeldimensionering bör utföras för alla aerosoler och ångor som kan kondenseras och bilda aerosoler. För att möjliggöra exponering av alla relevanta områden i luftvägarna, rekommenderas aerosoler med en aerodynamisk diameter (MMAD) i intervallet 1 till 4 µm med en geometrisk standardavvikelse (σ_g) i intervallet 1,5 till 3,0 (8) (13) (14). Även om en rimlig ansträngning krävs för att uppfylla denna standard bör en sakkunnig bedömning göras om detta inte kan uppnås. Till exempel kan metalldimma understiga denna standard, och laddade partiklar, fibrer och hygroskopiska material (som ökar i storlek i den fuktiga miljön i andningsvägarna) kan överstiga denna standard.

Beredning av testkemikalie i en vehikel

15. En vehikel kan användas för att generera en lämplig koncentration och partikelstorlek av testkemikalien i atmosfären. I regel bör vatten ha företräde. För att uppnå den erfordrade partikelstorleksfördelningen bör partikelmaterialet utsättas för mekaniska processer, emellertid bör försiktighet iaktas så att man inte sönderdelar eller förändrar testkemikalien. I de fall där mekaniska processer tros ha förändrat testkemikalien sammansättning (t.ex. extrem temperatur från friktionen vid överdriven fräsning), bör testkemikalien sammansättning verifieras analytiskt. Det är viktigt att testkemikalien inte förorenas. Det är inte nödvändigt att testa icke-spröda granulära material som avsiktligt är sammansatta så att de inte kan inhaleras. Ett friktionstest ska användas för att visa att inga inandningsbara partiklar bildas när det granulära materialet hanteras. Om ett friktionstest bildar inandningsbara partiklar ska ett test utföras avseende inhalationstoxicitet.

Kontrolldjur

16. Det är inte nödvändigt med en parallell negativ (luft-) kontrollgrupp. Om en annan vehikel än vatten används för att skapa testatmosfären ska en vehikelkontrollgrupp endast användas när historiska data om inhalationstoxicitet inte är tillgängliga. Om en toxicitetsstudie av en testkemikalie som har beretts i en vehikel inte påvisar någon toxicitet, framgår det att vehikeln är icke-toxisk vid den testade koncentrationen, och därmed finns det inget behov av en vehikelkontroll.

ÖVERVAKNING AV EXPONERINGSFÖRHÅLLANDEN

Kammarens luftflöde

17. Luftflödet genom kammaren ska omsorgsfullt kontrolleras, kontinuerligt övervakas och registreras minst en gång i timmen under varje exponering. Övervakningen av testatmosfärens koncentration (eller stabilitet) är en

integrerad mätning av samtliga dynamiska parametrar och ett indirekt sätt att kontrollera alla relevanta atmosfärsskapande dynamiska parametrar. Särskild hänsyn bör tas för att undvika återandning i enbart nos-kammare i de fall där luftflödet genom exponeringssystemet är otillräckligt för att ge ett dynamiskt flöde i testkemikalie-atmosfären. Det finns föreskrivna metoder som kan användas för att visa att återandning inte sker under de valda processförhållandena (8) (15). Syrehalten bör vara minst 19 % och koncentrationen av koldioxid bör inte överstiga 1 %. Om det finns anledning att tro att dessa standarder inte kan uppfyllas bör man mäta koncentrationen av syre och koldioxid.

Kammarens temperatur och relativa fuktighet

18. Kammarens temperatur bör upprätthållas vid 22 ± 3 °C. Relativ fuktighet i djurens andningsområden, gäller både enbart nos och helkroppsexponering, bör övervakas och registreras minst tre gånger under tidsperioder upp till 4 timmar, och varje timme vid kortare tidsperioder. Den relativa fuktigheten bör företrädesvis upprätthållas inom intervallet 30 till 70 %, men detta kanske inte är möjligt (t.ex. vid testning av vattenbaserade blandningar) eller inte mätbart på grund av att testkemikalien stör själva testmetoden.

Testkemikalie: nominell koncentration

19. När det är möjligt bör den nominella koncentrationen i exponeringskammaren beräknas och registreras. Den nominella koncentrationen är massan av den genererade testkemikalien dividerad med den totala volymen av luft som passerade genom kammarsystemet. Den nominella koncentrationen används inte för att karakterisera djurens exponering, men en jämförelse mellan den nominella och den faktiska koncentrationen ger en indikation på testsystemets genereringseffektivitet, och kan därmed användas för att upptäcka genereringsproblem.

Testkemikalie: faktisk koncentration

20. Den faktiska koncentrationen är testkemikalies koncentration i djurets andningsområde i en inhalationskammare. Faktiska koncentrationer kan erhållas antingen genom särskilda metoder (t.ex. direkt provtagning, adsorptiva eller kemiskt reaktiva metoder, och efterföljande analytisk karakterisering) eller av icke-specifika metoder såsom gravimetrisk filteranalys. Användningen av gravimetrisk analys är endast acceptabel för pulveraerosoler bestående av en enda komponent eller aerosoler bestående av vätskor med låg flyktighet, och bör stödjas av en lämplig preklinisk studie med kemikaliespecifik karakterisering. Koncentrationen i pulveraerosoler bestående av flera komponenter kan också bestämmas genom gravimetrisk analys. Detta kräver dock analysresultat som visar att sammansättningen av luftburet material liknar startmaterialet. Om denna information inte finns tillgänglig kan det vara nödvändigt med en ny analys av testkemikalien (helst i sitt luftburna tillstånd) under loppet av studien. För medel i aerosolform som kan förångas eller sublimeras bör man kunna visa att samtliga faser uppsamlades med den valda metoden. Målkoncentrationerna och de nominella och faktiska koncentrationerna ska finnas med i undersökningsrapporten, men endast de faktiska koncentrationerna används i de statistiska analyserna för att beräkna värdena för dödlig koncentration.
21. En sats av testkemikalien ska användas, om möjligt, och provet ska lagras under sådana förhållanden att det bibehåller sin renhet, homogenitet och stabilitet. Inför starten av studien bör det finnas en beskrivning av testkemikalien som inbegriper dess renhet och, om det är tekniskt genomförbart, identitet, och kvantiteterna av identifierade föroreningar och orenheter. Detta kan visas genom, men är inte begränsat till, följande data: retentionstid och relativ topparea, molekylvikt från masspektroskopi eller gaskromatografianalys, eller andra uppskattningar. Även om testlaboratoriet inte ansvarar för provets identitet kan det vara klokt att man i stora drag bekräftar karakteriseringen (t.ex. färg, fysisk natur etc.).
22. Exponeringsatmosfären ska hållas så konstant som möjligt och övervakas kontinuerligt och/eller intermittent beroende på analysmetoden. När intermittent provtagning används bör prover på kammaratmosfären tas minst två gånger under en fyratimmarsstudie. Om det inte är möjligt på grund av begränsade luftflöden eller låga koncentrationer, kan ett prov tas under hela exponeringsperioden. Om märkta prov-till-prov-fluktationer förekommer, bör man för de påföljande koncentrationerna som ska testas ta fyra prover per exponering. Provtagning av kammarkoncentrationer från individuella kammare bör inte avvika från den genomsnittliga koncentrationen med mer än ± 10 % för gaser och ångor, och inte med mer än ± 20 % för flytande eller fasta aerosoler. Tiden tills kammaren når jämvikt (t_{95}) bör beräknas och registreras. Varaktigheten för en exponering spänner sig över den tid som testkemikalien genereras och tar hänsyn till den tid som krävs för att uppnå t_{95} . Riktlinjer för att uppskatta t_{95} finns i GD 39 (8).
23. För mycket komplexa blandningar bestående av ångor/gaser och aerosoler (t.ex. förbränningsatmosfärer och testkemikalier framdrivna från därför avsedd slutanvändningsprodukt/-utrustning). Varje fas kan bete sig annorlunda i en inhalationskammare så åtminstone en indikatorsubstans ska väljas (analyt), vanligtvis den huvudsakliga aktiva substansen i blandningen för varje fas (ångor/gas och aerosol). När testkemikalien är en blandning ska den analytiska koncentrationen i den totala blandningen rapporteras, inte bara för den aktiva ingrediensen eller komponenten (analyten). Ytterligare information om faktisk koncentration finns i GD 39 (8).

Testkemikalie: partikelstorleksfördelning

24. Aerosolers partikelstorleksfördelning bör fastställas minst två gånger under varje 4-timmars exponering med hjälp av en kaskadimpaktor eller ett alternativt instrument såsom en aerodynamisk partikelsorterare. Om man kan visa ett likvärdigt resultat från en kaskadimpaktor eller det alternativa instrumentet, kan man använda det sistnämnda under hela försöket. En andra enhet, till exempel ett gravimetriskt filter eller en impinger/gasbubblare, bör användas parallellt med det primära instrumentet för att bekräfta uppsamlingsprestandan hos det primära instrumentet. Masskoncentrationen som erhållits genom analys av partikelstorleken ska ligga inom rimliga gränser för den masskoncentration som erhållits genom filteranalys (se GD 39 (8)). Om likvärdigheten kan påvisas i ett tidigt skede av försöket kan ytterligare bekräftande mätningar utelämnas. Av djurskyddsskäl bör åtgärder vidtas för att minimera ofullständiga uppgifter som kan leda till att exponeringen måste upprepas. Partikeldimensionering bör utföras för ångorna, om det finns en möjlighet att kondensen kan bilda en aerosol, eller om partiklar upptäcks i ångatmosfären som kan göra så att faserna blandas (se punkt 14).

PROCEDUR**Huvudtest**

25. Tre djur per kön eller sex djur av det mer mottagliga könet används för varje steg. Om andra gnagare än råttor utsätts för enbart nos, kan de maximala exponeringstiderna justeras för att minska artspecifikt lidande. Koncentrationsnivån som ska användas som startdos väljs från en av fyra fasta nivåer, och nivån på utgångskoncentrationen bör vara den som mest sannolikt producerar toxicitet hos vissa av de doserade djuren. Testprogrammet för gaser, ångor och aerosoler (inkluderad i tilläggen 2–4) representerar testningen med avslutningsvärdena för CLP-kategorierna 1–4 (9) för gaser (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4h) (tillägg 2), för ångor (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4h) (tillägg 3) och för aerosoler (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4h) (tillägg 4). Kategori 5, som inte är genomförd i förordning (EG) nr 1272/2008 (9) avser koncentrationer över respektive gränskoncentration. För varje startkoncentration gäller respektive testprogram. Beroende på antalet humant avlivade eller döda djur följer testproceduren de angivna pilarna tills en kategorisering kan göras.
26. Tidsintervallet mellan exponeringsgrupperna fastställs genom start, varaktighet och allvarlighetsgrad för tecknen på toxicitet. Exponering av djur vid nästa koncentrationsnivå ska fördröjas tills det finns rimlig anledning att anta att de tidigare testade djuren överlever. En period på tre eller fyra dagar mellan exponeringarna för varje koncentrationsnivå rekommenderas för observationen av fördröjd toxicitet. Tidsintervallet kan anpassas på lämpligt sätt, t.ex. i händelse av ofullständiga responser.

Toleranstest

27. Toleranstestet används när testkemikalien är känd eller förväntas vara praktiskt taget icke-toxisk dvs. framkallar endast en toxisk reaktion över den reglerade gränskoncentrationen. Information om testkemikalies toxicitet kan erhållas genom kunskap om liknande testade substanser eller liknande blandningar, med beaktande av identitet och procentandel av komponenter kända för att ha en signifikant toxicitet. I situationer när det finns lite eller ingen information om dess toxicitet, eller testkemikalien förväntas vara toxisk, ska huvudtestet utföras (ytterligare vägledning finns i GD 39 (8)).
28. Enligt det normala förfarandet exponeras tre djur per kön, eller sex djur av det mer mottagliga könet för en koncentration av respektive 20 000 ppm för gaser, 20 mg/l för ångor och 5 mg/l för damm/ånga (om möjligt), vilket fungerar som toleranstestet för denna testmetod. När man testar aerosoler bör det primära målet vara att uppnå en andningsbar partikelstorlek (dvs. en MMAD på 1–4 µm). Det är möjligt för de flesta kemikalier med en koncentration på 2 mg/l. Testning av aerosoler med högre än 2 mg/l ska endast göras om en andningsbar partikelstorlek kan uppnås [se GD 39 (8)]. I enlighet med GHS (16), avrådes testning över en gränskoncentration på grund av djurskyddsskäl. Testning i GHS-kategori 5 (16), som inte är genomförd i förordning (EG) nr 1272/2008 (9), ska endast övervägas om det finns en stor sannolikhet för att resultaten från ett sådant test har en direkt relevans för skydd av människors hälsa, och motivering lämnas i studierapporten. När det gäller potentiellt explosiva testkemikalier bör man vara noga med att undvika förhållanden som är gynnsamma för en explosion. För att undvika onödig användning av djur ska ett test genomföras utan djur före toleranstestet, för att se till att förhållandena i kammaren kan uppnås för ett toleranstest.

OBSERVATIONER

29. Djuren bör ofta observeras kliniskt under exponeringsperioden. Efter exponeringen ska kliniska observationer göras minst två gånger på dagen för exponeringen, eller oftare om djurens respons på behandlingen indikerar det, och därefter minst en gång per dag under en period av 14 dagar. Observationstidens längd är inte fast, utan bör bestämmas utifrån art och tidpunkt för de första kliniska tecknen samt längden på återhämtningsperioden. De tillfällen då tecken på toxicitet uppträder och försvinner är viktig, särskilt om tecknen på toxicitet visar en tendens att fördröjas. Alla observationer registreras systematiskt med individuella registreringar för varje djur. Djur som påträffas döende och djur som visar tecken på uppenbar smärta och/eller svårt ihållande lidande ska avlivas skonsamt av djurskyddsskäl. Försiktighet bör iakttas vid utförande av undersökningar för kliniska tecken

på toxicitet med djur som ser dåliga ut och har övergående respiratoriska förändringar till följd av exponeringsförloppet, inte misstas för behandlingsrelaterade verkningar. Principerna och kriterierna som finns sammanfattade i vägledningsdokumentet om humana endpoints bör tas i beaktande (7). När djur avlivas av humanitära skäl eller påträffas döda, ska tidpunkten för dödsfallet registreras så noggrant som möjligt.

30. Observationer vid buren bör omfatta förändringar i bur och päls, ögon och slemhinnor, samt även andningsorganen, cirkulationsorganen och det autonoma och centrala nervsystemet, samt kroppsmotorik och beteendemönster. Om möjligt bör eventuella skillnader mellan lokala och systematiska effekter noteras. Uppmärksamhet bör fästas vid observationer av tremor, konvulsioner, salivutsöndring, diarré, letargi, sömn och koma. Mätningen av rektala temperaturer kan ge belägg för bradypnéreflex eller hypo/hypertermi relaterat till behandling eller inspärning.

Kroppsvikt

31. Vikten hos individuella djur bör registreras en gång under aklimatiseringsperioden på exponeringsdagen innan exponeringen (dag 0), och åtminstone dag 1, 3 och 7 (och därefter varje vecka), och vid tidpunkten för när döden eller avlivningen inträffar om dag 1 överskrids. Kroppsvikt är en erkänt viktig indikator för toxicitet och djur som uppvisar en ihållande minskning på $\geq 20\%$ jämfört med värden från förstudien bör noggrant övervakas. Djur som överlever vägs och avlivas skonsamt i slutet av perioden efter exponeringsperioden.

Patologi

32. Alla försöksdjur, inklusive de som avlider under testet eller avlivas och tas bort från undersökningen av djurskyddsskäl bör obduceras. Om en obduktion inte kan utföras omedelbart efter att ett dött djur har upptäckts, bör djuret kylas (inte frysas) vid en temperatur som är tillräckligt låg för att minimera autolys. Obduktioner ska utföras så snart som möjligt, vanligtvis inom en dag eller två. Alla betydande patologiska förändringar bör registreras för varje djur med särskild uppmärksamhet på eventuella förändringar i luftvägarna.
33. Ytterligare undersökningar inklusive a priori genom beräkning kan anses utöka studiens tolkningsvärde, såsom mätning av lungvikt hos överlevande råttor, och/eller ge prov på irritation genom mikroskopundersökningen av luftvägarna. Undersökta organ kan innefatta sådana som uppvisar betydande skador och som härrör från djur som överlevt 24 timmar eller mer, och organ kända för, eller som förväntas påverkas. Mikroskopisk undersökning av hela luftvägarna kan ge användbar information om testkemikalier som är reaktiva med vatten, såsom syror och hygrokopiska testkemikalier.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

34. Individuella data om kroppsvikt och obduktionsfynd bör tillhandahållas. Kliniska observationsdata bör sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antalet djur som använts, antalet djur som visar tecken på toxicitet, antalet djur som avlidit under testet eller som avlivats av humanitära skäl, tidpunkten då det enskilda djuret har avlidit, beskrivning och tidsförlopp för toxiska verkningar och reversibilitet, samt obduktionsfynd.

Testrapport

35. Testrapporten ska omfatta följande information, när så är lämpligt:

Försöksdjur och djurhållning

- Beskrivning av burförhållanden, inklusive antal (eller förändring av antal) djur per bur, strö, omgivningstemperatur och relativ fuktighet, ljusperiod och identifiering av kost.
- Art/stam som används och motivering för användning av andra arter än råtta.
- Djurens antal, ålder och kön.
- Metod för randomisering.
- Uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet kosttyp/-källa och vattenförsörjning).
- Beskrivning av eventuella förtestbetingelser inbegripet kost, karantän och behandling av sjukdomar.

Testkemikalie

- Fysikalisk natur, renhet och, i förekommande fall, fysikalisk-kemiska egenskaper (inbegripet isomerisering).
- Identifieringsdata och CAS-nummer (Chemical Abstract Services), om detta är känt.

Vehikel

- Motivering för användning av vehikel och valet av vehikel (om annat än vatten).
- Historiska eller parallella data som visar att vehikeln inte påverkar studiens slutresultat.

Inhalationskammare

- Beskrivning av inhalationskammaren inklusive mått och volym.
 - Ursprung och beskrivning av utrustning som används för exponering av djur så väl som generering av atmosfär.
 - Utrustning för mätning av temperatur, fuktighet, partikelstorlek och faktisk koncentration.
 - Luftkälla, behandling av luft som tillförs/extraheras och system som används för luftkonditionering.
 - Metoder som används för kalibrering av utrustning för att säkerställa en homogen testatmosfär.
 - Tryckskillnad (positiv eller negativ).
 - Exponeringsportar per kammare (enbart nos), placering av djur i systemet (helkropp).
 - Temporal homogenitet/stabilitet för testatmosfären.
 - Placering av temperatur- och fuktighetsgivare och provtagning av testatmosfären i kammaren.
 - Luftflödes hastigheter, port för luftflöde och exponering (enbart nos), eller djurbelastning och kammare (helkropp).
 - Information om utrustningen som används för att mäta syre och koldioxid, i förekommande fall.
 - Tid som krävs för att uppnå jämvikt i inhalationskammaren (t_{95}).
 - Antal volymutbyten per timme.
 - Mätutrustning (i förekommande fall).
- Exponeringsdata*
- Grunden för valet av mållkoncentration i huvudstudien.
 - Nominella koncentrationer (den totala massan av testkemikalien som genereras i inhalationskammaren dividerad med luftvolymen som passerar genom kammaren).
 - Faktiska koncentrationer av testblandningar som insamlats från djurens andningsapparat, för blandningar som bildar heterogena fysikaliska former (gaser, ångor, aerosoler), där var och en kan analyseras separat.
 - Alla luftkoncentrationer ska rapporteras i viktenheter (t.ex. mg/l, mg/m³, etc.), enheter för volym (t.ex. ppm, ppb) kan också redovisas inom parantes.
 - Partikelstorleksfördelning, aerodynamisk massmediandiameter (MMAD) och geometrisk standardavvikelse (σ_g), inklusive metoderna för deras beräkning. Individuella partikelstorleksanalyser bör rapporteras.

Testbetingelser

- Uppgifter om testkemikalieberedning, inklusive uppgifter om eventuella procedurer som använts för att minska partikelstorleken hos fasta substanser eller för att bereda testlösningar. I de fall där mekaniska processer kan ha förändrat testkemikalien sammansättning ska analysresultaten inkluderas för att bekräfta dess sammansättning.
- En beskrivning (helst med ett diagram) av utrustningen som används för att generera testatmosfären och exponera djuren för denna atmosfär.
- Uppgifter om den kemiska analysmetod som använts och metodvalidering (inklusive effektiviteten för återvinningen av testkemikalien från provtagningsmediet).
- Grunden för valet av testkoncentration.

Resultat

- Tabelluppställning av kammarens temperatur, fuktighet och luftflöde.
- Tabelluppställning av kammarens nominella och faktiska koncentrationsdata.
- Tabelluppställning av partikelstorleksdata som omfattar provtagningsdata, partikelstorleksfördelning och beräkning av MMAD och σ_g .
- Tabelluppställning av responsdata och koncentrationsnivåer för varje djur (dvs. djur som uppvisar tecken på toxicitet inklusive mortalitet, natur, allvarlighetsgrad och effekternas varaktighet).
- Den individuella kroppsvikten hos djuren som samlats in på studiedagar, datum och tid för dödsfall som inträffat före planerad avlivning, tidsförlopp för första tecken på toxicitet och om dessa var reversibla för varje enskilt djur.
- Obduktionsfynd och histopatologiska fynd för varje djur, om detta finns tillgängligt.
- CLP-kategoriklassificering och LC₅₀-avslutningsvärde;

Diskussion och tolkning av resultaten

- Särskild uppmärksamhet bör ges till beskrivningen av använda metoder för att uppfylla kriterierna för den här testmetoden, t.ex. koncentrationsgräns eller partikelstorlek.
- Partiklarnas andningsbarhet i ljuset av de övergripande resultaten bör åtgärdas, särskilt om kriterierna för partikelstorlek inte kunde uppfyllas.
- Överensstämmelsen mellan metoderna som används för att bestämma nominell och faktisk koncentration, och förhållandet mellan faktisk och nominell koncentration bör ingå i den samlade bedömningen av studien.
- Den sannolika dödsorsaken och dominerande verkningsmekanism (systematisk mot lokal) bör behandlas.
- En förklaring bör ges om det fanns behov av att offra djur, som visade tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande, av humanitära skäl på grundval av kriterierna i OECD:s vägledningsdokument om humana endpoints (7).

LITTERATUR

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

- (4) Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC₅₀ Tests. *ALTEX* 1: 129–134.
 - (5) Chapter B.1 i denna bilaga, akut inhalationstoxicitet - metod för akut toxicitetsklass (ATC).
 - (6) OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Finns på [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
 - (7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Finns på [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
 - (8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Finns på [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
 - (9) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006 (EUT L 353, 31.12.2008, s. 1).
 - (10) Kapitel B.40 i denna bilaga, in vitro-test av hudkorrosivitet: bestämning av transkutant elektriskt motstånd (TER).
 - (11) Kapitel B.40 a i denna bilaga, in vitro-test av hudkorrosivitet: test med modell av human hud.
 - (12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Finns på [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
 - (13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.
 - (14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321–327.
 - (15) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27: 160–167.
 - (16) UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Finns på [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html]
-

Tillägg 1

DEFINITION

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

*Tillägg 2***Förfarande för varje startkoncentration för gaser (ppm/4 h)**Allmänna anmärkningar ⁽¹⁾

För varje startkoncentration ska förfarandet som är beskrivet i detta tillägg följas för respektive testprogram.

Tillägg 2 a: Startkoncentration är 100 ppm

Tillägg 2 b: Startkoncentration är 500 ppm

Tillägg 2 c: Startkoncentration är 2 500 ppm

Tillägg 2 d: Startkoncentration är 20 000 ppm

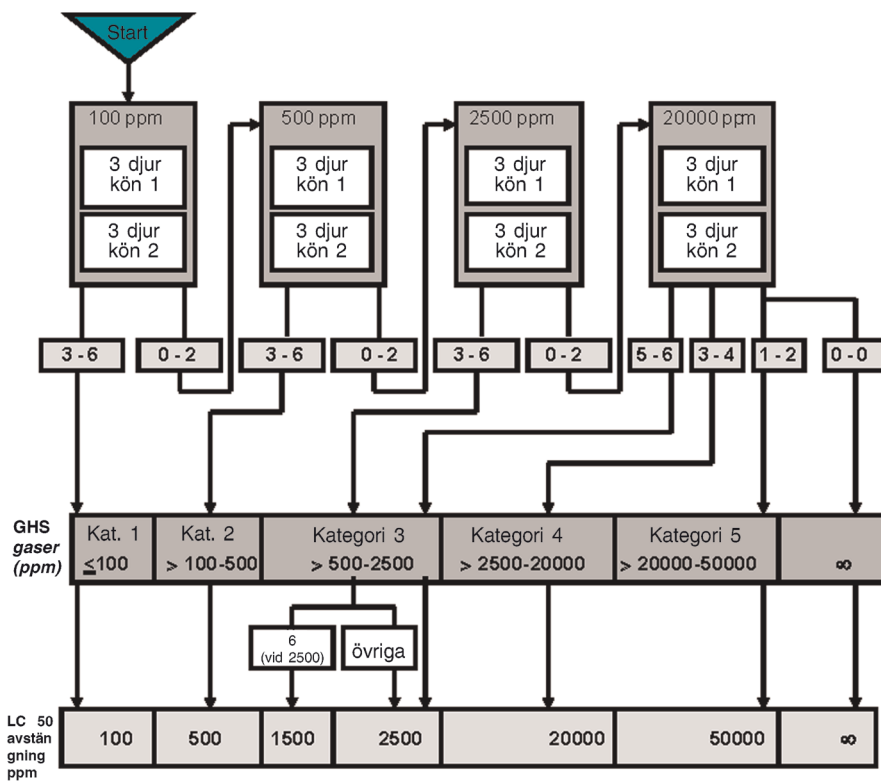
Beroende på antalet humant avlivade eller döda djur ska testproceduren följa de angivna pilarna.

⁽¹⁾ I följande tabeller refereras till GHS (Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). EU-motsvarigheten är förordning (EG) nr 1272/2008. När det gäller akut inhalationstoxicitet, tillämpar inte förordning (EG) nr 1272/2008 (9) kategori 5.

Tillägg 2a

Akut inhalations toxicitet:

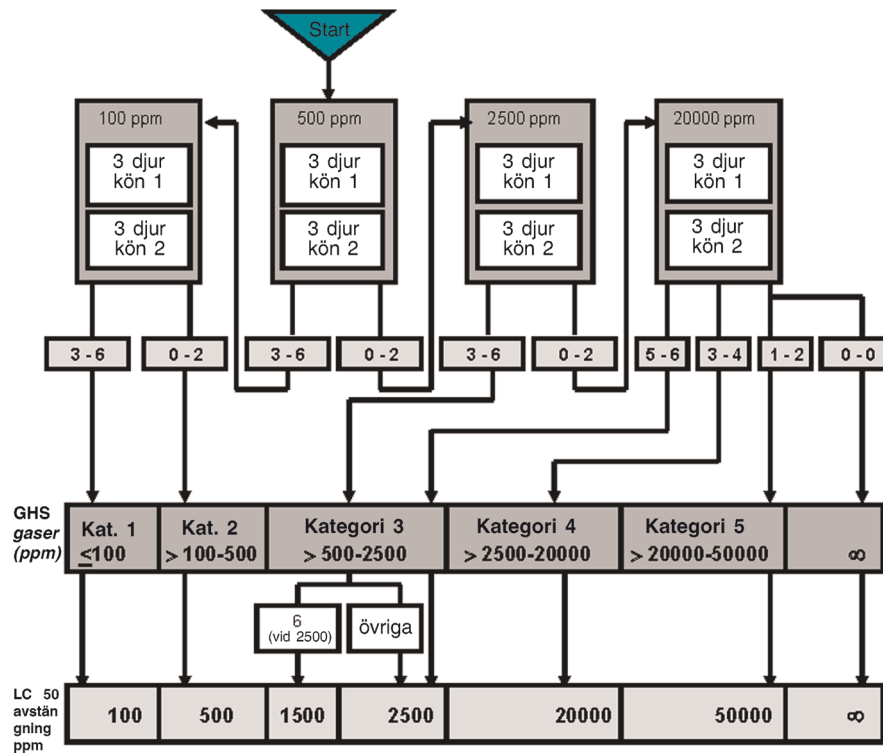
Testförfarande med en startkoncentration av 100 ppm/4 h för gaser



- 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet per steg
- 0-6: Antal döende eller döda djur/testad koncentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: oklassifierad
- Testning vid ≥ 20000 ppm/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

Tillägg 2b

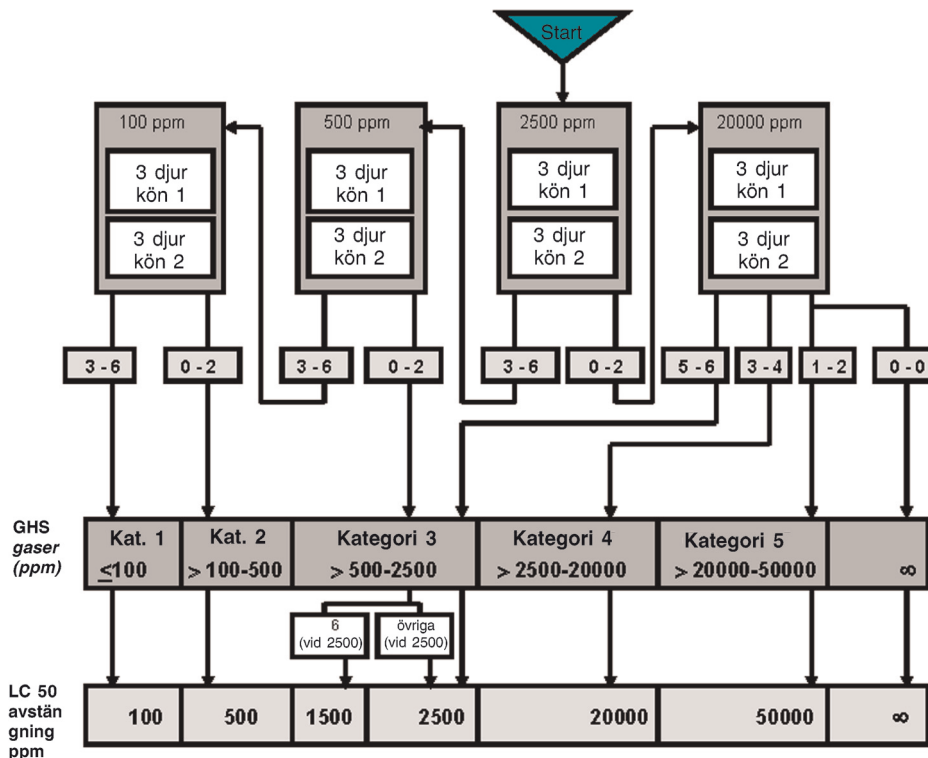
Akut inhalationstoxicitet:
Testförfarande med en startkoncentration av 500 ppm/4 h för gaser



- 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet per steg
- 0-6: Antal döende eller döda djur/testad koncentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: oklassifierad
- Testning vid ≥ 20000 ppm/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

Tillägg 2c

**Akut inhalationstoxicitet:
Testförfarande med en startkoncentration av 2 500 ppm/4 h för gaser**

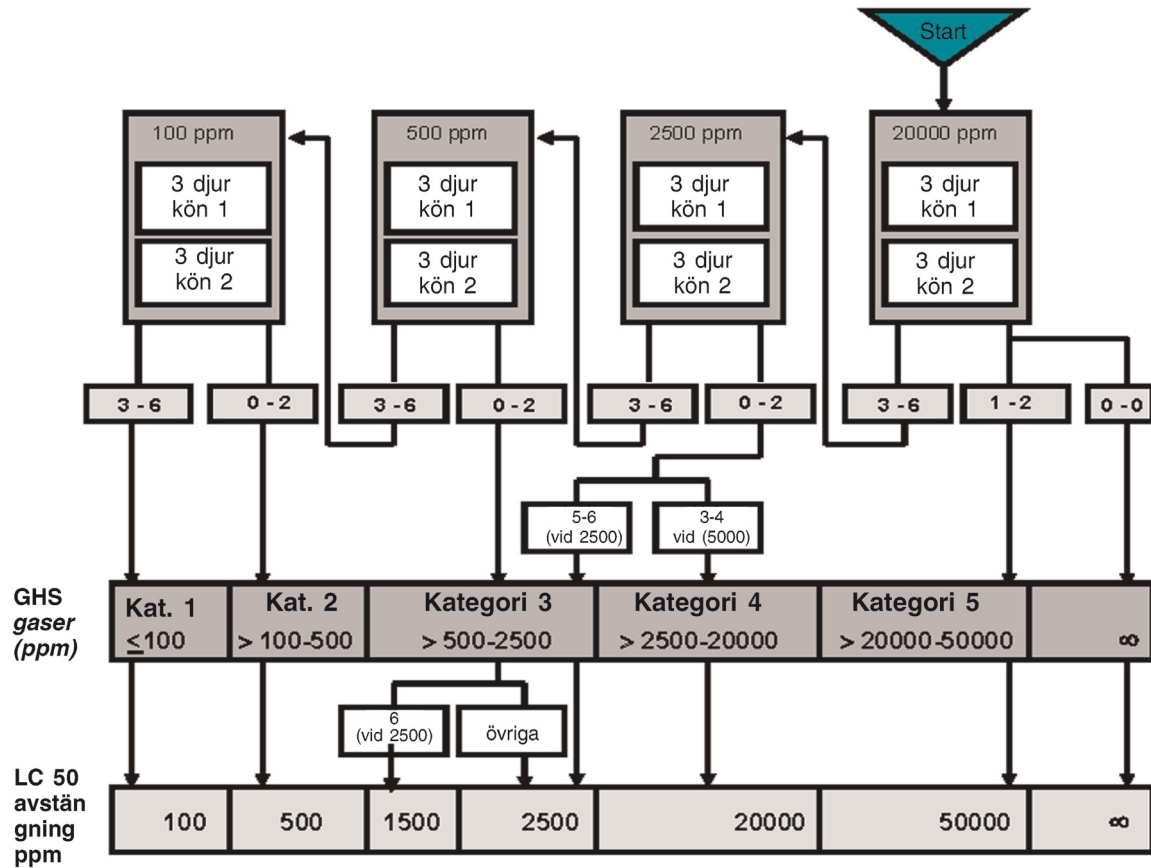


- 3 σ + 3 ϕ, eller 6 djur av det mer mottagliga könet används per steg
- 0-6: Antal döende eller döda djur/testad koncentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: oklassifierad
- Testning vid ≥ 20000 ppm/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

Tillägg 2d

Akut inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 20 000 ppm/4 h för gaser



- 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet används per steg
- 0-6: antal döende eller döda djur/testad koncentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: oklassifierad
- Testning vid ≥ 20000 ppm/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

Tillägg 3

Förfarande för varje startkoncentration för ångor (mg/l/4 h)Allmänna anmärkningar ⁽¹⁾

För varje startkoncentration ska förfarandet som är beskrivet i detta tillägg följas för respektive testprogram.

Tillägg 3 a: Startkoncentration är 0,5 mg/l

Tillägg 3 b: Startkoncentration är 2,0 mg/l

Tillägg 3 c: Startkoncentration är 10 mg/l

Tillägg 3 d: Startkoncentration är 20 mg/l

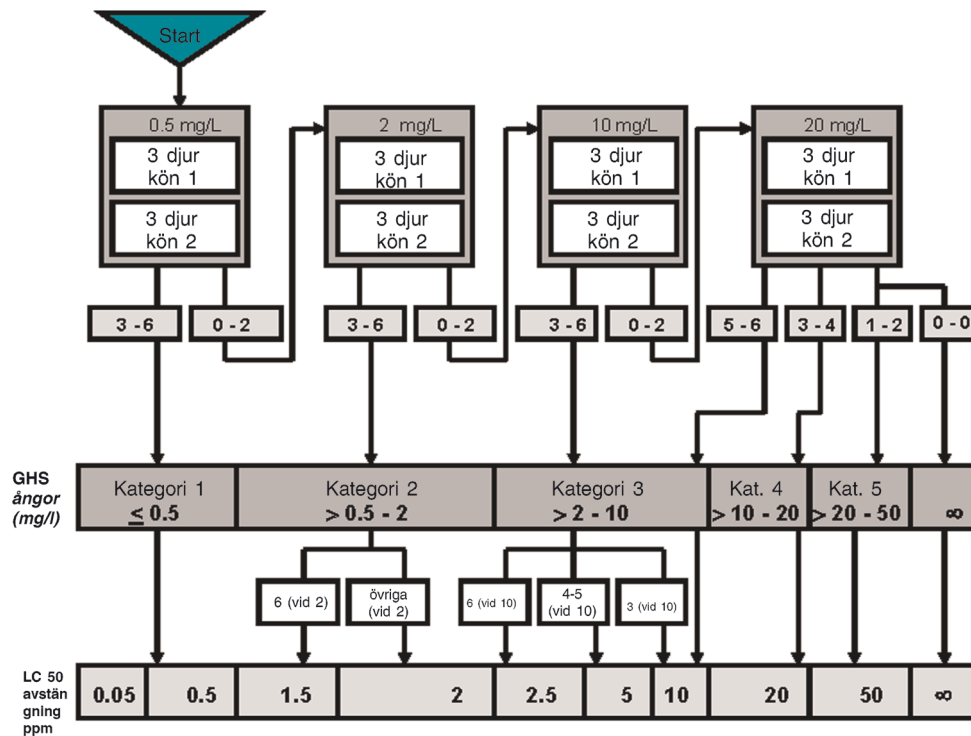
Beroende på antalet humant avlivade eller döda djur ska testproceduren följa de angivna pilarna.

⁽¹⁾ I följande tabeller refereras till GHS (Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)). EU-motsvarigheten är förordning (EG) nr 1272/2008. När det gäller akut inhalationstoxicitet, tillämpar inte förordning (EG) nr 1272/2008 (9) kategori 5.

Tillägg 3a

Akut inhalationstoxicitet:

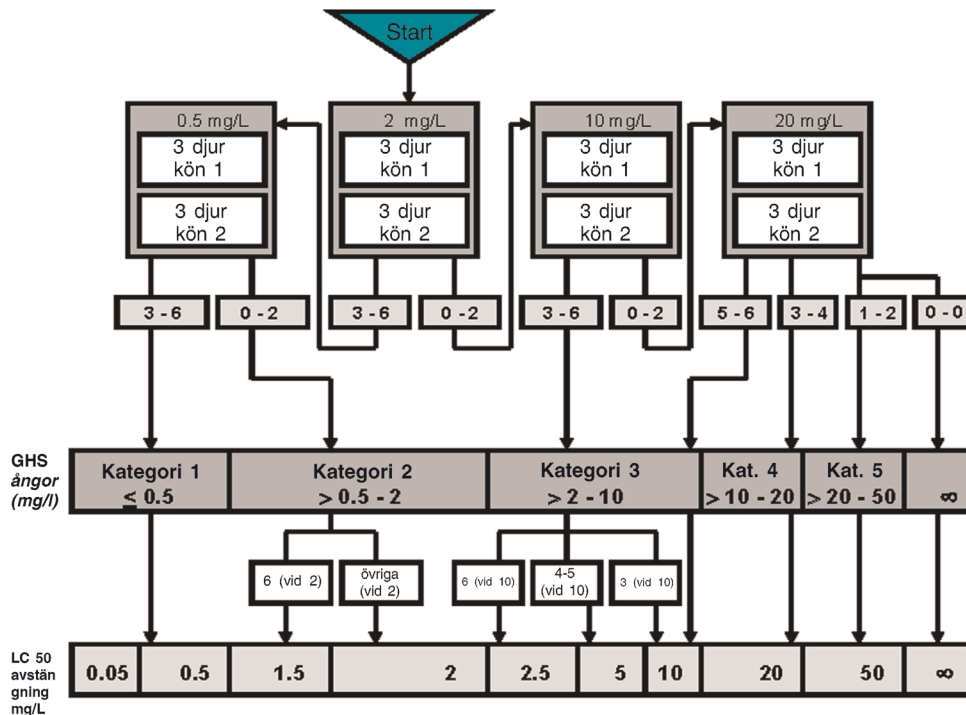
Testförfarande med en startkoncentration av 0,5 mg/L/4 h för ångor



- 3 σ + 3 φ , eller 6 djur av det mer mottagliga könet används per steg
- 0-6: antal döende eller döda djur/testad koncentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞ : oklassifierad
- Testning vid 50 mg/L/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

Tillägg 3b

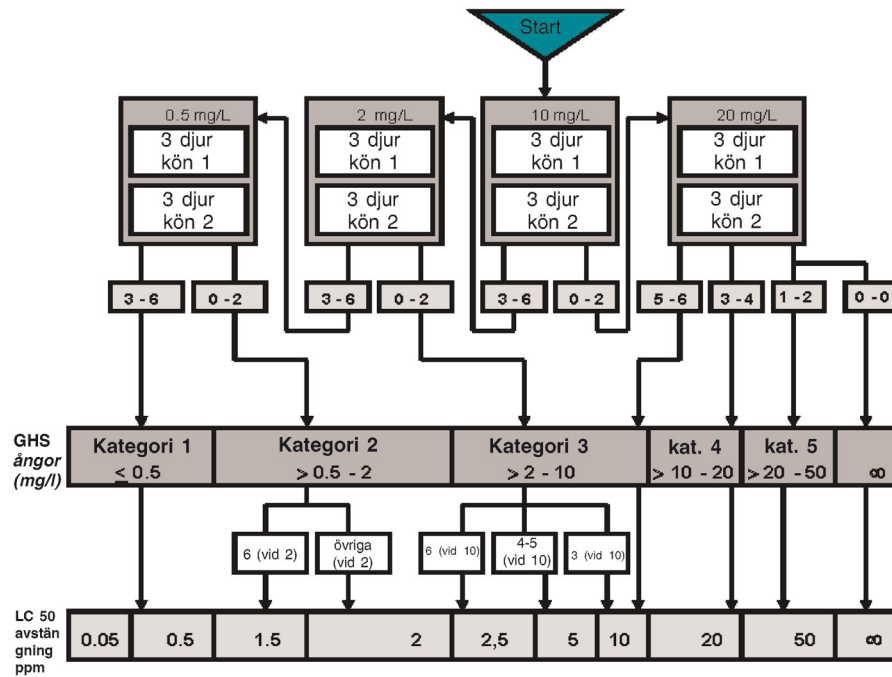
Akut Inhalationstoxicitet:
Testförfarande med en startkoncentration av 2 mg/L/4 h för ångor



- 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet används per steg
- 0-6: antal döende eller döda djur/testad koncentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: oklassifierad
- Testning vid 50 mg/L/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

Tillägg 3c

Akut Inhalationstoxicitet:
Testförfarande med en startkoncentration av 10 mg/L/4 h för ångor

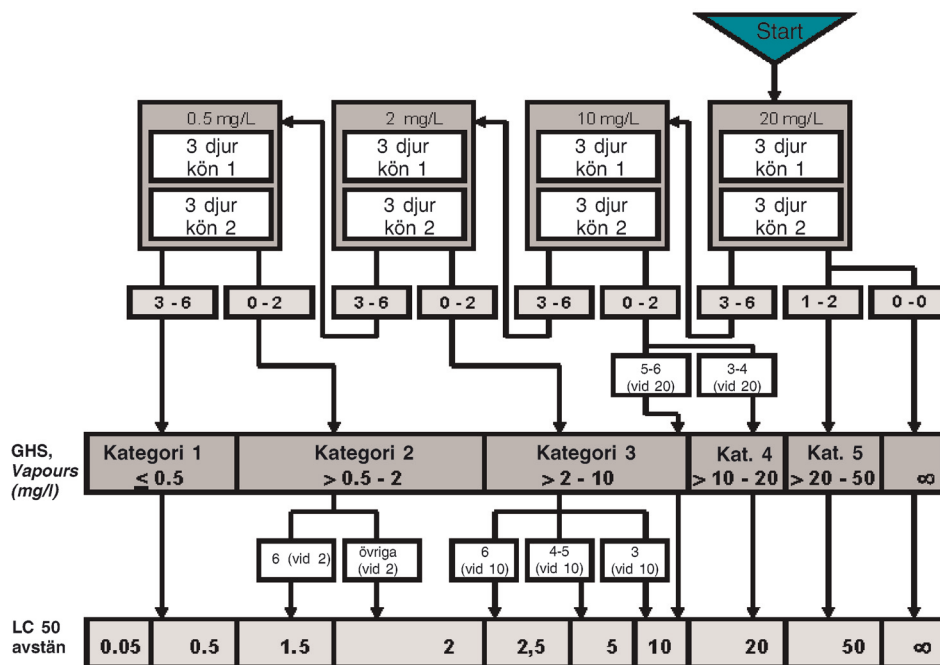


- 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet används per steg
- 0-6: antal döende eller döda djur/testad koncentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: oklassifierad
- Testning vid 50 mg/L/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

Tillägg 3d

Akut Inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 20 mg/L/4 h för ångor



- 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet används per steg
- 0-6: Antal döende eller döda djur/testad koncentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: oklassifierad
- Testning vid 50 mg/L/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

*Tillägg 4***Förfarande för varje startkoncentration för aerosoler (mg/l/4 h)**Allmänna anmärkningar ⁽¹⁾

För varje startkoncentration ska förfarandet som är beskrivet i detta tillägg följas för respektive testprogram.

Tillägg 4 a: Startkoncentration är 0,05 mg/l

Tillägg 4 b: Startkoncentration är 0,5 mg/l

Tillägg 4 c: Startkoncentration är 1 mg/l

Tillägg 4 d: Startkoncentration är 5 mg/l

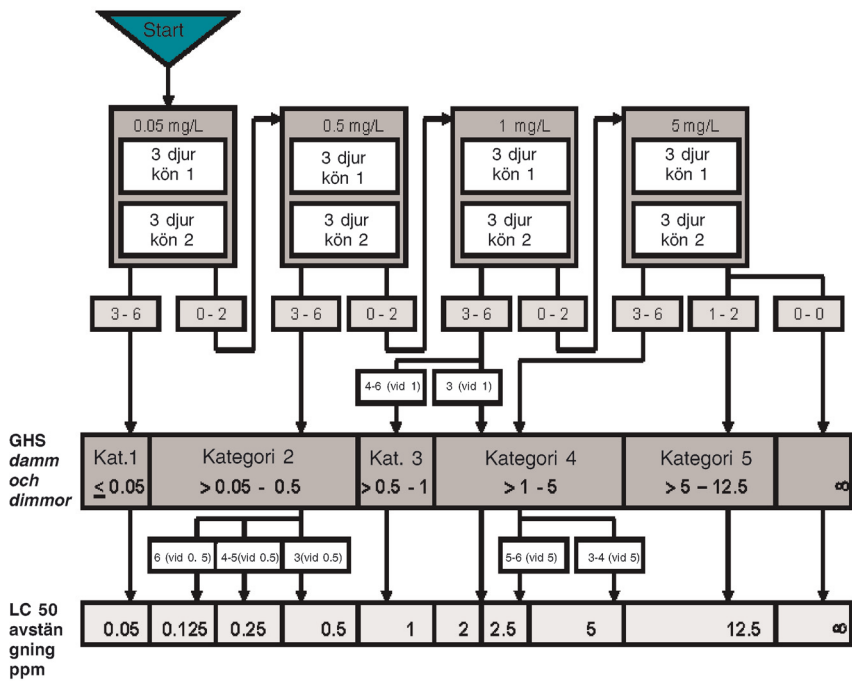
Beroende på antalet humant avlivade eller döda djur ska testproceduren följa de angivna pilarna.

⁽¹⁾ I följande tabeller refereras till GHS (Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)). EU-motsvarigheten är förordning (EG) nr 1272/2008. När det gäller akut inhalationstoxicitet, tillämpar inte förordning (EG) nr 1272/2008 (9) kategori 5.

Tillägg 4a

Akut Inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 0,05 mg/L/4h för ångor

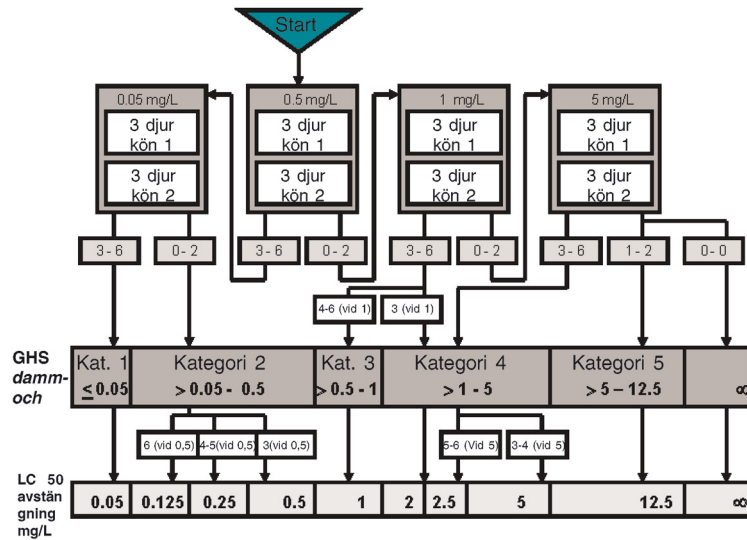


- 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet används per steg
- 0-6: Antal döende eller döda djur/testad koncentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: oklassifierad
- Testning vid 12,5 ng/L/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

Tillägg 4b

Akut inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 0,5 mg/L/4h för aerosoler

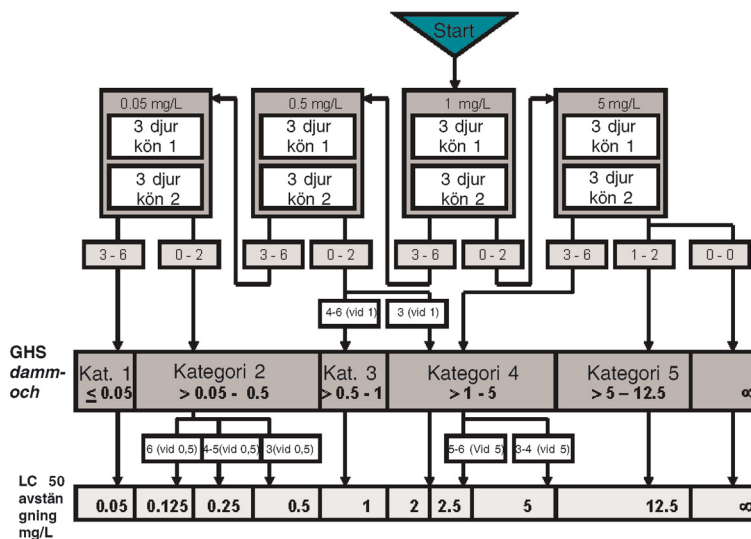


- 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mot tagliga könet används per steg
- 0-6: Antal döende eller döda djur/testad koncentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: oklassifierad
- Testning vid 12,5 mg/L/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

Tillägg 4c

Akut inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 1 mg/L/4h för aerosoler

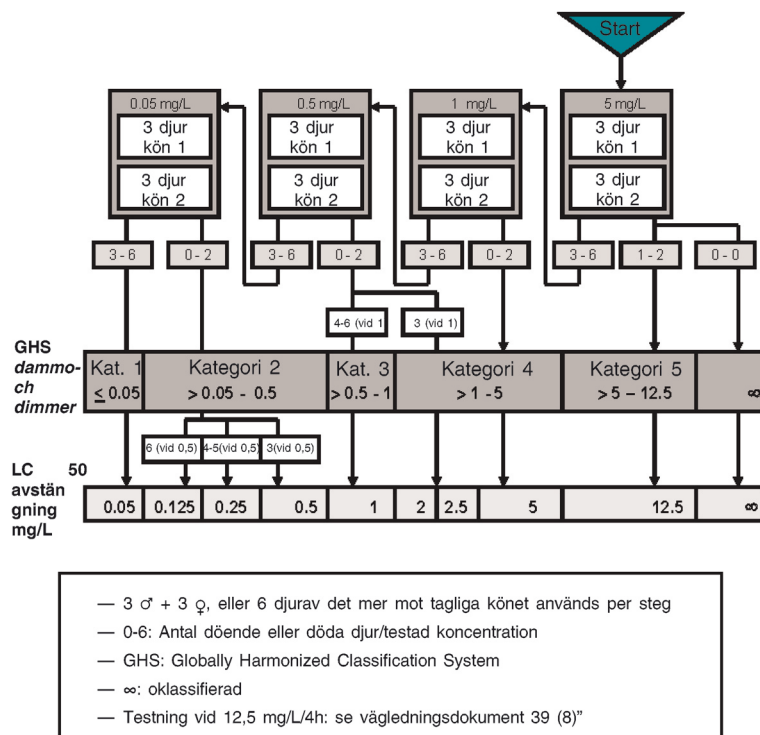


- 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mot tagliga könet används per steg
- 0-6: Antal döende eller döda djur/testad koncentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: oklassifierad
- Testning vid 12,5 mg/L/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

Tillägg 4d

Akut Inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 5 mg/L/4h för aerosoler



9) Kapitel C.10 ska ersättas med följande:

”C.10 SIMULATIONSTEST AEROB AVLOPPSVATTENBEHANDLING C.10-A: ENHETERNA FÖR AKTIVERAT SLAM – C.10-B BIOFILMER

C.10-A: Enheterna för aktiverat slam

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje 303 (2001). På 1950-talet insåg man att de ytaktiva ämnen som nyligen tagits i bruk orsakade kraftig skumbildning i avloppsreningsverk och i vattendrag. De avlägsnades inte helt under den aeroba behandlingen och i vissa fall kunde annat organiskt material inte avlägsnas. Detta föranledde många undersökningar om hur ytaktiva ämnen kunde avlägsnas från avloppsvatten och huruvida nya kemikalier producerade av industrin svarade på avloppsvattenrening. För detta användes modeller som representerar de två huvudtyperna av aerob biologisk avloppsvattenrening (aktiverat slam och perkolations- eller bakteriefilter). Det hade varit mycket opraktiskt och dyrt att distribuera varje ny kemikalie och övervaka storskaliga reningsverk, även på lokal basis.

INLEDANDE ÖVERVÅGANDEN

Enheterna för aktiverat slam

2. I beskrivningarna har modellerna för enheterna för aktiverat slam varierat i storlek mellan 300 ml och cirka 2 000 ml. Vissa av modellerna hade stora likheter med storskaliga anläggningar, med slamsedimenteringstankar där det sedimenterade slammet pumpas tillbaka till luftningstanken, medan andra inte hade sedimenteringsutrustning, t.ex. Swisher (1). Apparaturens storlek är en kompromiss – å ena sidan måste den vara tillräckligt stor för att de mekaniska operationerna ska fungera väl och för att tillåta tillräcklig provtagningsvolym utan att påverka själva operationen och å andra sidan får den inte vara så stor att utrymmes- och materialbehoven blir för stora.

3. Två typer av utrustning som har använts i omfattande utsträckning och med tillfredsställande resultat är Husmann-enheter (2) och Porous Pot-enheter (3) (4), som först användes för studier av ytaktiva ämnen; dessa beskrivs i denna testmetod. Även andra enheter har använts med framgång, t.ex. Eckenfelder (5). Detta simuleringsstest är relativt dyrt och resurskrävande, och därför gjordes en parallell undersökning av enklare och förmånligare screeningtest (se kapitel C.4 A–F i denna bilaga) (6). Erfarenheterna med olika ytaktiva ämnen och andra kemikalier har visat att de som klarade screeningtest (lätt nedbrytbara) också bröts ned vid simuleringsstestningen. Vissa av dem som inte klarade screeningtest klarade test för lättnedbrytbarhet (kapitlen C.12.7 och C.19.8 i denna bilaga), men endast en del i denna senare grupp bröts ned vid simuleringsstest, medan de kemikalier som inte klarade test för lättnedbrytbarhet inte bröts ned i simuleringsstest (9) (10) (11).
4. För vissa ändamål kan simuleringsstest som gjorts vid en enda uppsättning betingelser vara tillräckliga, och då uttrycks resultaten som en procentandel avlägsnad kemikalie eller upplöst organiskt kol (DOC). En beskrivning av ett sådant test ges i denna testmetod. Till skillnad från den tidigare versionen av detta kapitel, där endast en enda typ av apparatur för behandling av syntetiskt avloppsvatten i kopplad utformning med användning av en relativt primitiv metod för kassering av slam beskrevs, erbjuder denna beskrivning ett antal variationer. Den innehåller beskrivningar av alternativa typer av apparatur, arbets sätt, avloppsvatten och avlägsnande av kasserat slam. Denna text följer nära texten till ISO 11733 (12), som granskades i detalj vid utarbetningen, även om metoden inte har varit föremål för ringtest.
5. För andra ändamål krävs en mer exakt kännedom om testkemikalies koncentration i utflödet, vilket i sin tur kräver en mer omfattande metod. Som exempel kan nämnas att kasseringen av slam måste kontrolleras exaktare under varje dag och under hela testperioden, och enheterna måste köras med ett antal olika andelar kasserat slam. För en heltäckande metod bör tester även köras vid två eller tre olika temperaturer; en sådan metod beskrivs av Birch (13) (14) och sammanfattas i tillägg 6. De nuvarande kunskaperna är dock inte tillräckliga för att slå fast vilken av de kinetiska modellerna som kan tillämpas på biologisk nedbrytbarhet för kemikalier vid avloppsrening och allmänt taget i vattenmiljö. Tillämpningen av Monod-kinetik (exempel ges i tillägg 6) begränsas till kemikaliehalter på minst 1 mg/l, men det finns de som anser att även detta återstår att bevisa. I tillägg 7 anges tester vid koncentrationer som mer sanningsenligt återspeglar koncentrationerna i avloppsvatten, men sådana tester och tester enligt tillägg 6 finns angivna i tilläggen, och inte som separata testmetoder.

Filter

6. Modelleringen av perkolationsfilter har ägnats mycket mindre uppmärksamhet, kanske för att de är besvärliga och mindre kompakta än modellerna för aktivslamanläggningar. Gerike m.fl. utvecklade enheter med bakteriefilter (trickling filter) och använde enheterna i kopplat utförande (15). Dessa filter var relativt stora (höjd 2 m, volym 60 l) och varje filter krävde så mycket som 2 liter avloppsvatten i timmen. Baumann m.fl. (16) simulerade bakteriefilter genom att fylla 1 m långa rör (14 mm innerdiameter) med remsor av polyesterfleece som först hade hållits i koncentrerat aktiverat slam i 30 minuter. Testkemikalien i form av ensam kolkälla i en mineral-saltlösning matades ned i det vertikala röret och den biologiska nedbrytbarheten bedömdes enligt mätningar av DOC i utflödet och CO₂ i utkommande gas.
7. Biofilter har även simulerats på annat sätt (15) – innerskivorna i roterande rör som har en lätt horisontell lutning matas med avloppsvatten (cirka 250 ml/timme) med och utan testkemikalie, och de uppsamlade utflödena analyseras för DOC och/eller den berörda testkemikalien.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

8. Denna metod är avsedd för att bestämma eliminering samt primär och/eller slutlig biologisk nedbrytning av vattenlösliga organiska kemikalier som görs av aeroba mikroorganismer i ett kontinuerligt fungerande testsystem som simulerar aktivslamprocessen. Ett lättnedbrytbart organiskt medium och den organiska testkemikalien fungerar som kolkälla och energikälla för mikroorganismerna.
9. Två kontinuerligt arbetande testenheter (aktivslamanläggningar eller Porous Pot-enheter) körs parallellt under identiska betingelser som väljs enligt teständamålet. Normalt är den hydrauliska medelretentionstiden 6 timmar och slammets medelålder (slamretentionstid) 6–10 dagar. Slam kasseras genom en av två metoder, testkemikalien tillsätts i regel i en koncentration mellan 10 mg/l upplöst organiskt kol (DOC) och 20 mg/l DOC till inflödet (organiskt medium) endast till en av enheterna. Den andra enheten används som kontrollenhet för att bestämma den biologiska nedbrytbarheten för det organiska mediet.
10. Frekvent tagna prover av utflödet analyseras för DOC (helst) eller kemisk syreförbrukning (COD), samt koncentrationen av testkemikalie (om så krävs genom specifik analys) i utflödet från enheten som matas med testkemikalie. Skillnaden mellan utflödeskoncentrationerna DOC eller COD i test- och kontrollenheterna antas bero på testkemikalien eller dess organiska metaboliter. Denna skillnad jämförs med inflödets koncentration DOC eller COD på grund av testkemikalien, för att bestämma elimineringen av testkemikalien.

11. Den biologiska nedbrytbarheten kan i regel särskiljas från biologisk adsorption genom detaljerad analys av eliminering/tid-kurvan och kan ofta bekräftas genom test för biologisk lättnedbrytbarhet med användning av aklimatiserat inokulat från enheten som matas med testkemikalie.

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

12. Testkemikalien renhet, vattenlöslighet, flyktighet och adsorptionsegenskaper bör vara kända, för att resultaten ska kunna tolkas korrekt. I regel kan flyktiga och olösliga kemikalier inte testas, om inte särskilda åtgärder vidtas (se tillägg 5). Likaså bör den kemiska strukturen eller minst den empiriska formeln vara känd, med tanke på kalkylering av teoretiska värden och/eller kontroll av uppmätta parametervärden, t.ex. teoretisk syreförbrukning (ThOD), upplöst organiskt kol (DOC) och kemisk syreförbrukning (COD).
13. Information om testkemikalien toxicitet för mikroorganismer (se tillägg 4) kan vara till nytta vid val av lämpliga testkoncentrationer och kan vara väsentlig för en korrekt tolkning av låga värden för biologisk nedbrytbarhet.

GODKÄNNANDENIVÅER

14. Enligt den ursprungliga tillämpningen av detta simuleringstest (bekräftande test) på primär biologisk nedbrytning av ytaktiva ämnen krävs mer än 80 % eliminering av den berörda kemikalien för att det ytaktiva ämnet ska få släppas ut på marknaden. Om 80 % eliminering inte uppnås, kan detta simuleringstest (bekräftande test) tillämpas, och det ytaktiva ämnet får endast släppas ut på marknaden förutsatt att mer än 90 % av kemikalien elimineras. Generellt gäller för kemikalier inte frågan om godkänt/ ej godkänt, och värdet på den procentuella eliminering som erhållits kan användas i uppskattningsberäkningar av den sannolika miljökoncentration som kan användas vid farobedömning för kemikalier. Resultaten tenderar att följa ett "allt eller inget"-mönster. I ett antal studier av rena kemikalier konstaterades att elimineringsprocenten för DOC var > 90 % i mer än tre fjärdedelar av fallen och > 80 % i över 90 % av fallen för kemikalier som över huvud taget visade betydande grad av biologisk nedbrytbarhet.
15. Relativt få kemikalier (t.ex. ytaktiva ämnen) förekommer i avloppsvatten i de koncentrationer (cirka 10 mg C/l) som används i detta test. Vissa kemikalier kan vara hämmande vid dessa koncentrationer, medan elimineringskinetiken för andra kemikalier kan vara annorlunda vid låga koncentrationer. En exaktare bedömning av nedbrytningen kan göras med användning av modifierade metoder med realistiskt låga koncentrationer av testkemikalien, och erhållna data kan användas för att beräkna kinetiska konstanter. De nödvändiga försöksteknikerna har dock ännu inte utvärderats till fullo och de kinetiska modeller som beskriver reaktionerna vid biologisk nedbrytning har inte heller fastställts (se tillägg 7).

REFERENSKEMIKALIER

16. För att säkerställa att försöksförfarandet genomförs korrekt är det lämpligt att med vissa mellanrum testa kemikalier med känt beteende samtidigt som testkemikalier undersöks. Sådana kemikalier är adipinsyra, 2-fenylfenol, 1-naftol, 2,2'-bifenyldikarboxylsyra, 1-naftoesyra osv. (9) (10) (11).

TESTRESULTATENS REPRODUCERBARHET

17. Det finns betydligt färre rapporter från studier rörande simuleringstest än från test rörande lätt bionedbrytbarhet. Reproducerbarheten mellan (simultana) replikat är god (inom 10–15 %) för testkemikalier som bryts ner till minst 80 %, men för kemikalier som är mindre nedbrytbara är variationen större. Mycket varierande resultat (t.ex. 10 %, 90 %) har även noterats för vissa gränskemikalier vid olika tillfällen inom de nio veckor som gäller för testningen.
18. Endast små skillnader har konstaterats i resultat som erhållits med de två typerna av apparatur, men vissa kemikalier har brutits ned i större omfattning och mer genomgående vid användning av avloppsvatten från hushåll än vid användning av syntetiskt avloppsvatten enligt OECD.

METODBESKRIVNING

Apparatur

Testsystem

19. Testsystemet för en testkemikalie består av en testenhets och en kontrollenhet, men när endast specifika analyser görs (primär biologisk nedbrytbarhet) behövs endast en testenhets. En och samma kontrollenhet kan användas för flera testenheter som matas med samma eller olika testkemikalier. Om koppling används (tillägg 3) måste varje testenhets ha en separat kontrollenhet. Testsystemet kan vara en modell av aktivslamanläggning, Husmann-enhet (tillägg 1, figur 1) eller Porous Pot (tillägg 1, figur 2). I båda fallen behövs tillräckligt stora förvaringskärl för inflöde och utflöde, såväl som pumpar för att dosera inflödet, antingen blandat med testkemikalie eller separat.

20. Varje aktivslamanläggning består av ett luftningskärl med en känd kapacitet på cirka 3 liter aktiverat slam och en separator (sekundärsedimentering) som rymmer cirka 1,5 liter. Volymerna kan i viss utsträckning få variera om separatorns höjd justeras. Kärl av olika storlek tillåts om de används med jämförbara hydrauliska belastningar. Om det inte är möjligt att hålla temperaturen i testningsrummet inom rätt intervall rekommenderas användning av mantlade kärl med temperaturkontrollerat vatten. En mammutpump (airlift pump) eller doseringspump används för att återföra aktivslammet från separatorn till luftningskärl, antingen kontinuerligt eller intermittert.
21. Porous Pot-systemet består av en inre porös cylinder med konisk botten innanför ett lite större kärl med samma form men gjort av ett ogenomträngligt plastmaterial. Lämpligt material för innerkärlet är poröst polyetylen med maximal porstorlek på 90 µm och 2 mm tjocklek. Slammet separeras från det behandlade organiska mediet genom differentierad passage genom den porösa väggen. Utflödet går till det omgivande utrymmet från vilket det flödar över till uppsamlingskärlet. Ingen sedimentering sker och därför ingen återföring av slam. Hela systemet kan monteras in i ett termostatkontrollerat vattenbad. Porous Pots kan till en början blockeras och flöda över. Ersätt då den porösa fodringen med en ren fodring genom att först sifonera slammet från innerkärlet till ett rent kärl och ta ut den blockerade fodringen. När den ogenomträngliga yttre cylindern har rengjorts kan ett rent innerkärl sättas in och slammet tillsätts på nytt. Det slam som finns längs den blockerade fodringens väggar ska också skrapas loss omsorgsfullt och överförs. Rengör blockerade innerkärl genom att först avlägsna slamrester med en fin vattenstråle och därefter blöt lägga i utspädd lösning av natriumhypoklorit, sedan i vatten, och därefter omsorgsfullt skölja med vatten.
22. För luftning av slammet i luftningskärlen i båda systemen krävs lämpliga system, t.ex. sintrade kuber (diffusorstenar) och tryckluft. Vid behov ska luften rengöras genom passage genom lämpligt filter och tvätt. Systemet måste ha genomflöde av tillräckligt med luft för att aeroba betingelser ska bibehållas och slamflockarna hållas suspenderade under hela testningen.

Filtreringsapparat eller centrifug

23. Utrustning för filtrering av prover med membranfilter av lämplig porstorlek (nominell öppningsdiameter 0,45 µm) som adsorberar lösliga organiska kemikalier och har minimalt utsläpp av organiskt kol. Om de filter som används avger organiskt kol ska de tvättas försiktigt med hett vatten för att avlägsna detta kol. Alternativt kan man använda en centrifug som når upp till 40 000 m/s².

Analysutrustning

24. Apparatur som krävs för att bestämma

- DOC (upplöst organiskt kol) eller COD (kemisk syreförbrukning),
- specifik kemikalie, om så krävs,
- suspenderade fasta ämnen, pH, syrehalten i vatten,
- temperatur, surhet och alkalinitet,
- ammonium, nitrit och nitrat, om testet genomförs under nitrifikationsförhållanden.

Vatten

25. Kranvatten med mindre än 3 mg/l DOC. Bestäm alkaliniteten, om den inte redan är känd.
26. Avjoniserat vatten med mindre än 2 mg/l DOC.

Organiskt medium

27. Syntetiskt avloppsvatten, avloppsvatten från hushåll eller en blandning av båda kan användas som organiskt medium. Det har visat sig (11) (14) att användning av enbart avloppsvatten från hushåll ofta ger ökad procentandel DOC-eliminering och t.o.m. möjliggör eliminering och biologisk nedbrytning av vissa kemikalier som inte bryts ned när syntetiskt avloppsvatten enligt OECD används. Det betyder att kontinuerlig eller intermittert tillsättning av avloppsvatten från hushåll ofta stabiliserar det aktiva slammet och även förbättrar sedimenteringsegenskaperna, som är en central faktor. Därför rekommenderas användning av avloppsvatten från hushåll. Mät DOC- eller COD-koncentrationen i varje ny sats av organiskt medium. Det organiska mediets surhet eller alkalinitet ska vara känd. Om det organiska mediet har låg surhet eller alkalinitet kan det krävas tillsats av lämplig buffert (natriumvätekarbonat eller kaliumdivätefosfat) för att pH i luftningskärl ska hållas kring 7,5 ± 0,5 under testet. Mängden buffert och tillsättningstidpunkten måste fastställas separat i varje enskilt fall. Om blandningar används antingen kontinuerligt eller intermittert, måste blandningens DOC (eller COD) hållas på ungefär konstant nivå t.ex. genom utspädning med vatten.

Syntetiskt slam

28. Per liter kranvatten upplöses följande: 160 mg pepton, 110 mg köttextrakt, 30 mg urea, 28 mg vattenfritt dikaliumvätefosfat (K_2HPO_4), 7 mg natriumklorid (NaCl), 4 mg kalciumkloriddihydrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) och 2 mg magnesiumsulfatheptahydrat ($Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$). Detta syntetiska avloppsvatten enligt OECD är ett exempel, och ger en medelkoncentration på cirka 100 mg/l DOC i inflödet. Alternativt kan man använda andra sammansättningar med ungefär samma DOC-koncentration, som ligger närmare verkligt avloppsvatten. Om ett mindre koncentrerat inflöde krävs kan det syntetiska avloppsvattnet spädas ut med kranvatten (t.ex. 1:1) för att få en koncentration på cirka 50 mg/l. En sådan lägre koncentration i inflödet ger bättre tillväxt av nitrifierande organismer, och denna modifiering bör användas om undersökningen gäller simulering av nitrifierande reningsverk. Detta syntetiska avloppsvatten kan göras i destillerat vatten i en koncentrerad form och förvaras i 1 °C upp till en vecka. Späd vid behov ut med kranvatten. (Detta medium är dock inte tillfredsställande, kvävekoncentrationen är t.ex. mycket hög och kolhalten relativt låg, men det finns inga bättre förslag utom tillsättning av mera fosfat som buffert samt extra pepton).

Avloppsvatten från hushåll

29. Använd färsk bottensats av avloppsvatten som samlas upp dagligen från reningsanläggningar som i huvudsak tar emot avloppsvatten från hushåll. Avloppsvattnet ska samlas upp före primär sedimentering, från primärsedimenteringstankens överflödeskanal eller från matningen till aktivslamanläggningen, och det ska till övervägande del vara fritt från grova partiklar. Avloppsvattnet kan lagras några dagar före användningen (i regel dock inte längre än sju dagar) vid cirka 4 °C, om det går att påvisa att DOC (eller COD) inte har sjunkit betydligt (mindre än 20 %) under lagringen. För att undvika systemstörningar ska DOC (eller COD) i varje ny sats justeras före användningen till ett lämpligt konstant värde, t.ex. genom utspädning med kranvatten.

Aktiverat slam

30. Samla in aktiverat slam för inokulering från luftningstanken vid ett välskött reningsverk eller från en aktivslamenhet i laboratorieskala som i huvudsak tar emot avloppsvatten från hushåll.

Stamlösningar av testkemikalien

31. För kemikalier med rimlig löslighet bereds stamlösningar vid lämpliga koncentrationer (t.ex. 1–5 g/l) i avjoniserat vatten eller i mineraldelen av syntetiskt avloppsvatten (för olösliga och flyktiga kemikalier, se tillägg 5). Bestäm DOC och totalt organiskt kol (TOC) för stamlösningen och upprepa mätningarna för varje ny sats. Om skillnaden mellan DOC och TOC är större än 20 % bör testkemikaliens vattenlöslighet kontrolleras. Jämför testkemikaliens DOC eller koncentration uppmätt genom specifik analys av stamlösningen med det nominella värdet, för att kunna bedöma om utbytet är tillräckligt bra (i regel kan > 90 % förväntas). Särskilt för dispersioner bör man försäkra sig om att DOC kan användas som analytisk parameter; annars måste en analys-teknik som är specifik för testkemikalien användas. För dispersioner krävs centrifugering av proverna. För varje ny sats bör mätning göras av DOC, COD eller testkemikalien med specifik analys.
32. Bestäm stamlösningens pH. Extremvärden tyder på att tillsats av kemikalien kan påverka pH-värdet för det aktiverade slammet i testsystemet. I så fall bör stamlösningen neutraliseras till pH $7 \pm 0,5$ med små mängder organisk syra eller bas, men utfällning av testkemikalien bör undvikas.

FÖRFARANDE

33. Beskrivningen av förfarandet gäller för aktivslamenheter, och förfarandet måste i viss mån anpassas för Porous Pot-system.

Förberedning av inokulat

34. Inokulera testsystemet i början av testet med aktiverat slam eller ett inokulat med låg koncentration av mikroorganismer. Håll inokulatet luftat vid rumstemperatur fram tills det används (inom 24 timmar). Ta i det första fallet ett prov av aktiverat slam från luftningstanken vid ett välskött biologiskt reningsverk eller en laboratorieanläggning som i huvudsak tar emot avloppsvatten från hushåll. Om nitrifikationsförhållanden ska simuleras, ta slam från ett reningsverk med nitrifikation. Bestäm halten suspenderade fasta ämnen och koncentreras vid behov slammet genom sedimentering så att den volym som tillsätts testsystemet är minimal. Se till att startkoncentrationen torrsustans är kring 2,5 g/l.
35. Ta i det andra fallet 2–10 ml/l av utflödet från ett biologiskt reningsverk för avloppsvatten från hushåll som inokulat. För att få så många olika slags bakterier som möjligt kan inokulat tillsättas från flera olika källor, t.ex. ytvatten. I detta fall utvecklas och växer det aktiverade slammet i testsystemet.

Dosering av organiskt medium

36. Se till att inflödes- och utflödesbehållarna och rören från inflödeskärl och till utflödeskärl rengörs omsorgsfullt för att eliminera mikrotillväxt initialt och under hela testet. Montera testsystemet i ett temperaturkontrollerat rum (i regel 20–25 °C) eller använd testenheter med mantel. Förbered en tillräcklig volym av det organiska medium som ska användas (punkterna 27–29). Fyll först luftningskärl och separatorn med det organiska mediet och tillsätt sedan inokulat (punkterna 34, 35). Starta luftningen för att hålla slammet suspenderat och i aerob status och börja dosera inflöde och återföra sedimenterat slam. Dosera organiskt medium ur lagringskärlen till test- och kontrollenheternas luftningskärl (punkterna 20, 21) och samla in utflödena i liknande lagringskärl. För att få den normala hydrauliska retentionstiden på 6 timmar ska det organiska mediet pumpas med 0,5 l/tim. För att kontrollera detta mäts den dagliga mängden organiskt medium som doseras, genom att notera minskningen av volymen medium i lagringskärlen. För att bestämma effekterna av intermittert utsläpp och chockbelastning av kemikalier behövs andra doseringssätt.
37. Om det organiska mediet förbereds för användning för en period längre än 1 dag behövs kylning vid cirka 4 °C eller andra lämpliga konserveringsmetoder för att förebygga mikrotillväxt och biologisk nedbrytning utanför testenheter (punkt 29). Om syntetiskt avloppsvatten används kan detta förberedas och förvaras vid cirka 4 °C som koncentrerad stamlösning (t.ex. 10-faldig koncentration jämfört med den normala, se punkt 28). Denna stamlösning kan sedan blandas omsorgsfullt med lämplig volym kranvatten före användning eller alternativt pumpas direkt medan lämplig mängd kranvatten pumpas separat.

Dosering av testkemikalie

38. Tillsätt en lämplig volym stamlösning av testkemikalien (punkt 31) till lagringskärl för inflöde eller dosera direkt med en separat pump till luftningskärl. Den normala medelkoncentrationen av testkemikalie i inflödet ska vara mellan 10 och 20 mg/l DOC, och den högsta koncentrationen får inte överskrida 50 mg/l. Om testkemikalien har dålig vattenlöslighet eller om det sannolikt uppstår toxiska effekter, ska koncentrationen sänkas till 5 mg/l DOC eller lägre, men detta förutsätter att det finns en lämplig specifik analysmetod som kan användas (dispergerade testkemikalier som är dåligt vattenlösliga kan tillsättas med användning av speciella doseringstekniker, se tillägg 5).
39. Tillsättning av testkemikalie inleds efter en period under vilken systemet stabiliseras och det organiska mediets DOC avlägsnas effektivt (cirka 80 %). Det är viktigt att före tillsättningen av testkemikalie kontrollera att alla enheter arbetar lika effektivt, och om de inte gör det kan detta i regel avhjälpas genom att blanda de enskilda slammen och återfördela lika stora volymer till enheterna. När inokulat med cirka 2,5 g/l (torrvikt) aktiverat slam används, kan testkemikalien tillsättas från testets början, eftersom direkt tillsats av ökande mängder från början ger den fördelen att det aktiverade slammet bättre kan anpassa sig till testkemikalien. Oberoende av hur testkemikalien tillsätts, rekommenderas att relevant flödes hastighet och/eller volymerna i lagringskärl mäts regelbundet.

Hantering av aktiverat slam

40. Koncentrationen av fasta ämnen i aktiverat slam stabiliseras i regel under testets gång oberoende av vilket inokulat som används, inom gränserna 1–3 g/l (torrvikt), beroende på det organiska mediets kvalitet och koncentration, driftsbetingelserna, karaktären hos närvarande mikroorganismer och testkemikalies påverkan.
41. Bestäm koncentrationen suspenderade fasta ämnen i luftningskärlen minst varje vecka och kassera överskottsslam för att bibehålla en koncentration på 1–3 g/l (torrvikt); alternativt se till att slammets medelålder hålls konstant, i regel 6–10 dagar. Om slamretentionstiden är t.ex. 8 dagar, bör varje dag 1/8 av volymen aktiverat slam i luftningskärl avlägsnas och kasseras. Detta bör göras dagligen eller helst med användning av en automatisk intermittert arbetande pump. Att hålla koncentrationen suspenderade fasta ämnen konstant eller inom snäva gränser upprätthåller inte en konstant slamretentionstid, som är den variabel som avgör koncentrationen av testkemikalie i utflödet.
42. Avlägsna minst dagligen under testets gång allt slam som fastnat på luftningskärls och separatorns väggar för att återföra slammet till suspensionen. Kontrollera och rengör regelbundet alla rör för att förebygga tillväxt av biofilm. Återför sedimenterat slam från separatorn till luftningskärl, helst genom intermittert pumpning. I ett Porous Pot-system sker ingen återföring, men se till att rena innerkärl sätts in innan volymen i kärlen stiger betydligt (punkt 21).
43. I Husmann-enheter kan det förekomma dålig sedimentering och förlust av slam. Detta kan rättas till genom en eller flera av nedan förtecknade åtgärder, parallellt i test- och kontrollenheterna:

- Färskt slam eller flockningsmedel (t.ex. 2 ml/kärl med 50 g/l FeCl_3) kan tillsättas regelbundet, t.ex. varje vecka, men se till att FeCl_3 inte reagerar med eller leder till utfällning av testkemikalien.
- Mammutpumpen kan ersättas med en peristaltisk pump som ger ett slamåterföringsflöde som ungefär motsvarar det inflöde som ska användas och ger utveckling av en anaerob zon i det sedimenterade slammets (mammutpumpens geometri begränsar minimiflödet återfört slam till cirka 12-faldigt jämfört med inflödet).
- Slammets kan pumpas intermittent från separatorn till luftningskärlet (t.ex. 5 minuter per 2,5 timmar för att återföra 1–1,5 l/tim).
- Ett giftfritt skumhämmande medel (t.ex. silikonolja) i minimikoncentration kan användas för att förhindra förlust genom skumbildning.
- Luft kan ledas genom slammets i separatorn i korta kraftiga strålar (t.ex. 10 sekunder per timme).
- Det organiska mediet kan doseras intermittent till luftningskärlet (t.ex. 3–10 minuter per timme).

Provtagning och analys

44. Mät regelbundet koncentrationen upplöst syre, temperatur och pH i det aktiverade slammets i luftningskärlet. Se till att det alltid finns tillräckligt med syre (> 2 mg/l) och att temperaturen hålls inom det rekommenderade intervallet (i regel 20–25 °C). Håll pH vid $7,5 \pm 0,5$ genom att dosera små mängder oorganisk bas eller syra till luftningskärlet eller till inflödet, eller genom att öka det organiska mediets buffertkapacitet (se punkt 27). Om nitrifikation inträffar produceras syra, och oxidationen av 1 mg N producerar cirka 7 mg CO_3^- . Mätningens frekvens beror på vilka parametrar som mäts och på systemets stabilitet, och kan variera mellan dagliga och veckovisa mätningar.
45. Mät DOC eller COD i inflödena till kontroll- och testkärlet. Mät testkemikalens koncentration i testinflödet genom specifik analys eller uppskatta koncentrationen utifrån koncentrationen i stamlösningen (punkt 31), den använda volymen och mängden avloppsvatten som doseras in i testenheten. För att minska variationen hos koncentrationsdata rekommenderas att testkemikalens koncentration beräknas.
46. Ta lämpliga prover från uppsamlat utflöde (t.ex. 24 timmars sammansatt prov) och filtrera genom ett membran med porstorlek 0,45 μm eller centrifugera vid cirka 40 000 m^2 i cirka 15 minuter. Centrifugering bör användas om filtreringen är svår att utföra. Bestäm DOC eller COD minst i duplikat för att mäta slutlig biologisk nedbrytning och vid behov primär biologisk nedbrytning genom en specifik analys av testkemikalien.
47. Bestämning av COD kan ge upphov till analysproblem vid låga koncentrationer och rekommenderas därför endast om den använda testkoncentrationen är tillräckligt hög (cirka 30 mg/l). För starkt adsorberande kemikalier rekommenderas också att mängden adsorberad kemikalie i slammets mäts med en analysteknik som är specifik för testkemikalien.
48. Provtagningsfrekvensen beror på testets förväntade tidslängd. Rekommenderad frekvens är tre gånger per vecka. När enheterna har börjat fungera effektivt, vänta minst 1 vecka och högst 6 veckor efter tillförsel av testkemikalien för att anpassningen ska nå stabila förhållanden (steady state). Försök få minst 15 giltiga värden från plattåfasen (punkt 59), som normalt varar i 3 veckor, för utvärdering av testresultaten. Testet kan avslutas när tillräcklig elimineringsgrad nås (t.ex. $> 90\%$) och de 15 värden som representerar analyser som genomförts varje veckodag under 3 veckor finns att tillgå. Normalt ska testet inte pågå längre än 12 veckor från tillsättning av testkemikalien.
49. Om slammets nitrifieras och testkemikalens effekter på nitrifikationen ska undersökas, bör prover från utflödet från test- och kontrollenheterna analyseras minst en gång per vecka.
50. Alla analyser bör utföras så snart som möjligt, särskilt kvävebestämningarna. Om analyser måste senareläggas bör proverna förvaras i mörker vid cirka 4 °C i helt fyllda och tätt förslutna flaskor. Om proverna måste förvaras längre än 48 timmar bör de konserveras genom djupfrysning, syrabehandling (t.ex. 10 ml/l av en 400 g/l-svavelsyralösning) eller genom tillsats av lämpligt gift (t.ex. 20 ml/l av en 10 g/l-lösning av kvicksilver(II) klorid). Se till att konserveringstekniken inte påverkar analysresultaten.

Koppling av testenheter

51. Om koppling används (tillägg 3) bör samma mängd aktiverat slam (150–1 500 ml för luftningstankar som innehåller 3 liter vätska) dagligen bytas mellan testenhets luftningskärl och kontrollenheten. Om testkemikalien adsorberas starkt på slammet, bör endast separatorernas supernatant bytas. I båda fallen bör en korrektionsfaktor användas för beräkning av testresultaten (punkt 55).

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

52. Beräkna procentandelen DOC- eller COD-eliminering av testkemikalien för varje tidpunktsrelaterad bedömning, genom följande ekvation:

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

där

D_t = % eliminering av DOC eller COD vid tidpunkten t ,

C_s = DOC eller COD på grund av testkemikalien, helst uppskattat utifrån stamlösningen (mg/l),

E = uppmätt DOC- eller COD-värde i testutflödet vid tidpunkten t (mg/l),

E_o = uppmätt DOC- eller COD-värde i kontrollutflödet vid tidpunkten t (mg/l).

53. Graden av DOC- eller COD-eliminering i det organiska mediet i kontrollenheten bidrar till bedömningen av den biologiska nedbrytningsaktiviteten i det aktiverade slammet under testet. Den procentuella elimineringen kan beräknas genom följande ekvation:

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

där

D_B = % eliminering av DOC eller COD i det organiska mediet i kontrollenheten vid tidpunkten t ,

C_M = DOC eller COD i det organiska mediet i kontrollenhetens inflöde (mg/l).

Alternativt kan man beräkna procentuell eliminering av DOC eller COD som kan tillskrivas det organiska mediet plus testkemikalie i testenheten med följande ekvation:

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

där

D_T = % eliminering av DOC eller COD i totalt testinflöde,

C_T = DOC eller COD i totalt testinflöde eller beräknat utifrån stamlösningar (mg/l).

54. Beräkna elimineringen av testkemikalie som uppmäts med en specifik analysmetod vid varje bedömningstidpunkt, genom följande ekvation:

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

där

D_{ST} = % primär eliminering av testkemikalien vid tidpunkten t ,

S_i = uppmätt eller uppskattad koncentration av testkemikalien i testinflödet (mg/l),

S_e = uppmätt koncentration av testkemikalien i testutflödet vid tidpunkten t (mg/l).

55. Om kopplingsmodellen har använts, kompensera utspädningen av testkemikalien i luftningskärlet genom slamutbytet med användning av en korrigeringsfaktor (se tillägg 3). Om genomsnittlig retentionstid på 6 timmar och utbyte av halva volymen aktiverat slam i luftningskärlet har använts, måste de fastställda dagliga eliminationsvärdena (D_t , punkt 52) korrigeras för att få den faktiska elimineringsgraden D_{tc} för testkemikalien genom följande ekvation:

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

Presentation av testresultat

56. Plotta en kurva med procentuell eliminering D_t (eller D_{tc}) och D_{st} (om tillgänglig) mot tiden (se tillägg 2). Kurvan för eliminering av testkemikalien (i sig eller som DOC) kan ge underlag för vissa slutsatser om elimineringsprocessen.

Adsorption

57. Om kraftig DOC-eliminering observeras från början av testet, är det sannolikt att testkemikalien elimineras genom adsorption på det aktiva slammets fasta beståndsdelar. Detta kan påvisas genom att bestämma adsorberad testkemikalie genom specifik analys. Det är inte vanligt att elimineringen av DOC för adsorberbara kemikalier förblir kraftig genom hela testet; elimineringen är i regel kraftig i början för att sedan minska gradvis till ett jämviktsvärde. Om däremot den adsorberbara testkemikalien på ett eller annat sätt kan orsaka aklimatisering av den mikrobiella populationen, stiger testkemikaliens DOC-eliminering därefter och når ett högt platåvärde.

Lagfas

58. På samma sätt som vid statistiska screeningtest, kräver många testkemikalier en lagfas innan full biologisk nedbrytning inträffar. Under lagfasen sker aklimatisering eller anpassning av de nedbrytande bakterierna praktiskt taget utan eliminering av testkemikalien vid bakterietillväxtens inledande skede. Denna fas upphör och nedbrytningsfasen anses börja när cirka 10 % av den inledande mängden testkemikalie har eliminerats (efter att adsorption fått ske, i förekommande fall). Lagfasen är ofta mycket varierande och svår att reproducera.

Platåfas

59. Platåfasen i en elimineringskurva för ett kontinuerligt test definieras som den fas då maximal nedbrytning sker. Platåfasen bör pågå minst 3 veckor och ska ge cirka 15 uppmätta valida värden.

Genomsnittlig elimineringsgrad för testkemikalien

60. Beräkna medelvärdet utifrån testkemikaliens elimineringsvärden (D_t) under platåfasen. Avrundat till närmaste heltal (i %) är detta testkemikaliens elimineringsgrad. Likaså rekommenderas beräkning av medelvärdets 95 % konfidensintervall.

Eliminering av organiskt medium

61. Plotta det organiska mediets procentuella eliminering av DOC eller COD i kontrollenheten (D_B) mot tid. Ange genomsnittlig elimineringsgrad på samma sätt som för testkemikalien (punkt 60).

Indikation på biologisk nedbrytning

62. Om testkemikalien inte adsorberas i betydlig grad på det aktiverade slammets fasta beståndsdelar och elimineringskurvan har den typiska formen för en biologisk nedbrytningskurva med lagfas, kan nedbrytnings- och platåfaserna (punkterna 58, 59) med säkerhet tillskrivas biologisk nedbrytning. Om det har förekommit stark inledande eliminering kan simulationstestet inte användas för att skilja mellan biologiska och abiotiska elimineringsprocesser. I sådana fall, och i andra fall med tvivel rörande biologisk nedbrytning (t.ex. vid strippning), bör en analys göras rörande adsorberade testkemikalier eller ytterligare test med statisk biologisk nedbrytning genomföras baserade på parametrar som klart indikerar biologiska processer. Sådana test är syrepptagningsmetoder (kapitel C.4 D, E och F i denna bilaga (6)) eller test med mätning av koldioxidproduktion (kapitel C.4 C i denna bilaga (6)) eller ISO Headspace-metoden (18), med användning av förexponerat inokulat från simulationstestet. Om både DOC-eliminering och eliminering av specifik kemikalie har uppmätts och det finns betydande skillnader mellan elimineringsgraderna (DOC-elimineringen är lägre), tyder detta på att utflödena innehåller intermediära organiska produkter som kan vara svårare att bryta ned än den ursprungliga kemikalien.

Testresultatens giltighet

63. Information om inokulatets normala bionedbrytningsmönster fås genom en bestämning av det organiska mediets elimineringsgrad (punkt 53) i kontrollenheten. Testet kan anses vara giltigt om graden av DOC- eller COD-eliminering i kontrollenheten (-enheterna) är > 80 % efter två veckor och inget ovanligt har observerats.
64. Om en lätt biologiskt nedbrytbar (referens)kemikalie har använts, bör graden av biologisk nedbrytning (D_t , punkt 52) vara > 90 %.
65. Om testet genomförs under nitrifierande förhållanden bör medelkoncentrationen i utflödena vara < 1 mg/l ammoniumkväve och < 2 mg/l nitritkväve.
66. Om dessa kriterier (punkterna 63–65) inte uppfylls, upprepa testet med inokulat från en annan källa, testa en referenskemikalie och se över alla försöksförfaranden.

Testrapport

67. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

- Identifieringsdata.
- Fysikalisk natur och, när det är relevant, fysikalkemiska egenskaper.

Testbetingelser:

- Typ av testsystem och eventuella modifikationer för testning av olösliga och flyktiga kemikalier.
- Typ av organiskt medium.
- Andel av och egenskaper hos industriellt avloppsvatten som ingår, om kända.
- Inokulat, egenskaper och provtagningsplats(er), koncentration och eventuell förbehandling.
- Stamlösning av testkemikalien: DOC- och TOC-innehåll, i förekommande fall beredningsätt för suspension, använd testkoncentration, motivering om denna ligger utanför området 10–20 mg/l DOC, tillsättningsmetod, datum för första tillsättning, eventuella ändringar.
- Slammets medelålder och medelvärde för hydraulisk retentionstid, metod för kassering av slam, metoder för att undvika klumpbildning, förlust av slam osv.
- Analystekniker som använts.
- Testtemperatur.
- Slammets klumpbildningsegenskaper, slammets volymindex (SVI), suspenderad halt (MLSS).
- Avvikelser från standardförfaranden och alla omständigheter som kan ha påverkat resultaten.

Testresultat:

- Alla uppmätta data (DOC, COD), specifika analyser, pH, temperatur, syrehalt, suspenderade fasta ämnen, kvävekemikalier om relevant.
- Alla beräknade värden för D_t (eller D_{tC}), D_B och D_{St} i tabellform samt elimineringskurvor.
- Information om lag- och platåfaserna, testets tidslängd, elimineringsgrad för testkemikalien och för det organiska mediet i kontrollenheten, tillsammans med statistiska data och utlåtanden om biologisk nedbrytbarhet och testets giltighet.
- Diskussion om resultaten.

LITTERATUR

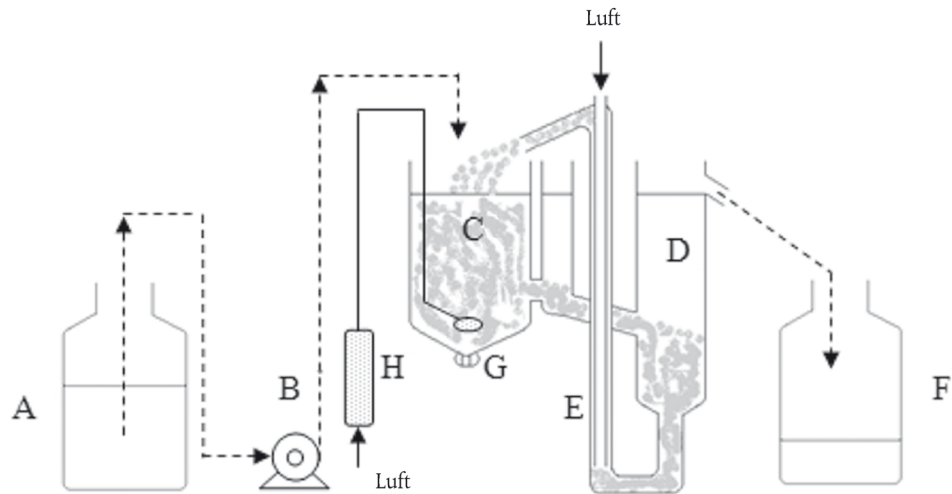
- (1) Swisher R. D. (1987), "Surfactant Biodegradation", andra utgåvan, Marcel Dekker Inc. New York, s. 1085.
 - (2) Tyska regeringen (1962). "Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents", *Bundesgesetzblatt*, Pt.1 nr 49, s. 698–706.
 - (3) Painter H. A. och King E. F. (1978a), "WRc porous-pot method for assessing biodegradability", *Technical Report No.70*, Water Research Centre, Medmenham, UK.
 - (4) Painter H. A. och King E. F. (1978b), "The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants", *Wat. Res.* 12, s. 909–915.
 - (5) Eckenfelder, W. W., (19), US EPA.
 - (6) Kapitel C.4 i denna bilaga, Bestämning av "lätt" bionedbrytbarhet.
 - (7) Kapitel C.12 i denna bilaga, Biologisk nedbrytbarhet – Modifierat SCAS-test.
 - (8) Kapitel C.19 i denna bilaga, Uppskattning av adsorptionskoefficienten (K_{oc}) i jord och avloppsslam med användning av högtrycksvätskekromatografi (HPLC).
 - (9) Gerike P. och Fischer W. K. (1979), "A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests", *Ecotox. Env. Saf.*, 3, s. 157–173.
 - (10) Gerike P. och Fischer W. K. (1981), som (9), "II Additional results and conclusions", *Ecotox. Env. Saf.*, 5, s. 45–55.
 - (11) Painter H. A. och Bealing D. (1989), "Experience and data from the OECD activated sludge simulation test", s. 113–138, "Laboratory tests for simulation of water treatment processes", *CEC Water Pollution Report 18*, Red. Jacobsen B. N., Muntau H., Angeletti G.
 - (12) ISO 11733 (1995; reviderad 2004), "Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium – activated sludge simulation test".
 - (13) Birch R. R. (1982), "The biodegradability of alcohol ethoxylates", XIII Jornado Com. Espanol. Deterg., s. 33–48.
 - (14) Birch R. R. (1984), "Biodegradation of nonionic surfactants", *J.A.O.C.S.* 61 (2), s. 340–343.
 - (15) Gerike P., Fischer W. K. och Holtmann W. (1980), "Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test", *Wat.Res.* 14, s. 753–758.
 - (16) Baumann U., Kuhn G. och Benz M. (1998), "Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z", *Umweltchem. Ökotox.* 10, s. 214–220.
 - (17) Her Majesty's Stationery Office (1982), "Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials", s. 91–98, ISBN 011 751661 9.
 - (18) ISO 14593 (1998), "Water Quality - Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels".
-

Tillägg 1

Figur 1

Utrustning för undersökning av biologisk nedbrytning

Husmann-enhet

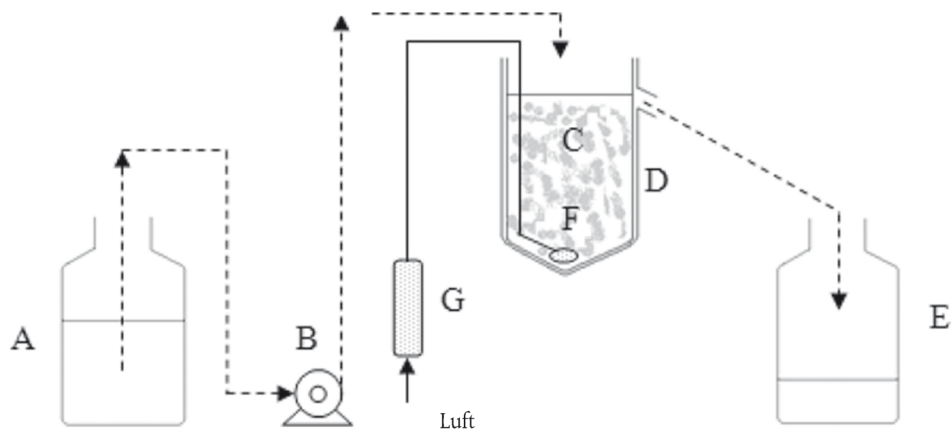


- | | |
|-------------------------------------|---------------------|
| A. Förvaringskärl | E. Mammutpump |
| B. Doseringspump | F. Uppsamlingskärl |
| C. Luftningskammare (kapacitet 3 l) | G. Luftningssystem |
| D. Sedimenteringskärl | H. Luftflödesmätare |

Figur 2

Utrustning för undersökning av biologisk nedbrytning

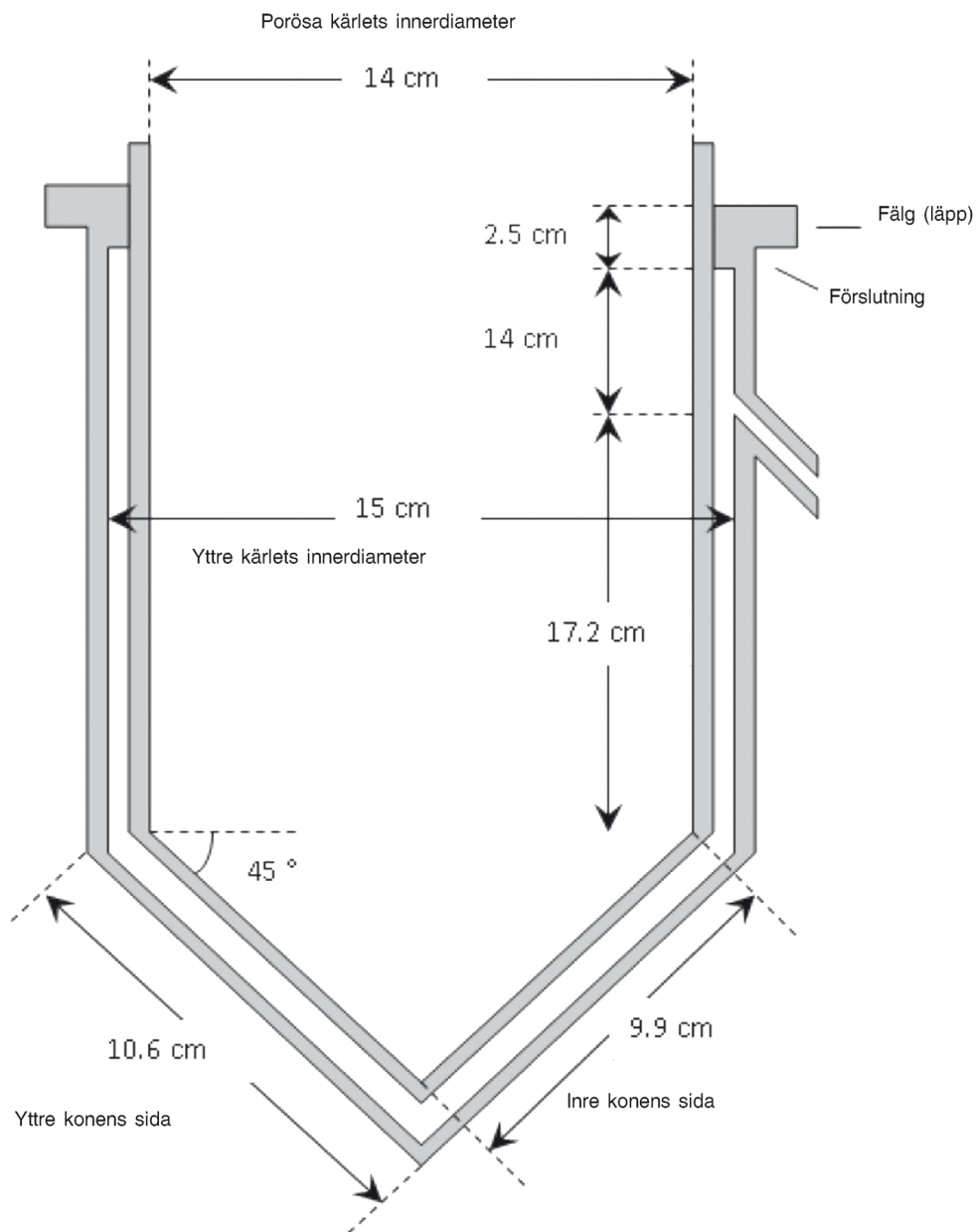
Porous Pot-enhet



- | | |
|-------------------------------|---------------------|
| A. Förvaringskärl | E. Uppsamlingskärl |
| B. Doseringspump | F. Diffusör |
| C. Poröst luftningskärl | G. Luftflödesmätare |
| D. Yttre ogenomträngligt kärl | |

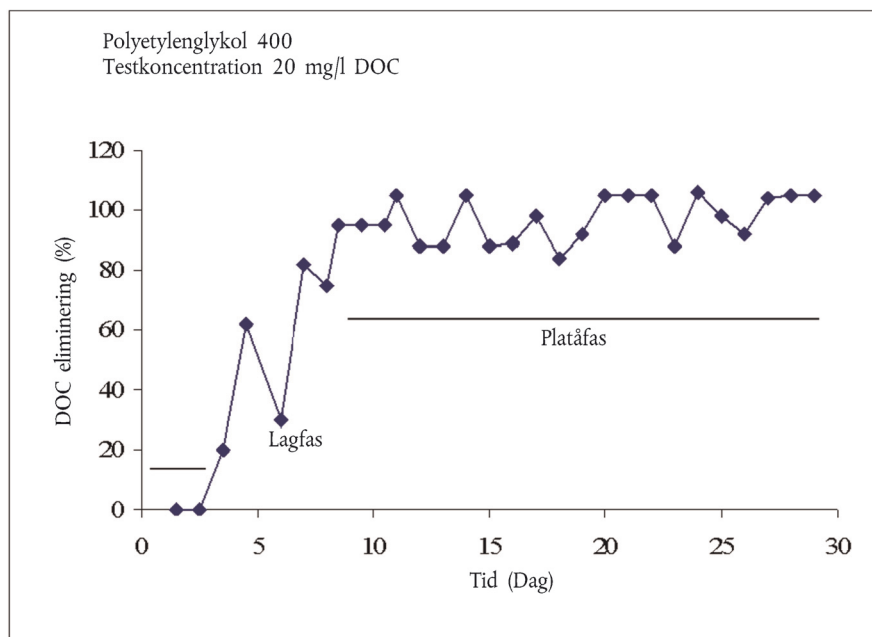
Figur 3

Detaljbeskrivning av Porös Pot-enhetens luftningskär (3 l)



Tillägg 2

Exempel på en elimineringskurva



Tillägg 3

[SOM INFORMATION]

KOPPLING AV TESTENHETER

För att försöka likställa de mikrobiella populationerna i testenheten som matas med avloppsvatten plus testkemikalie och kontrollenheten som endast matas med avloppsvatten, har man infört dagligt utbyte av slam (1). Förfarandet kallas koppling och metoden kallas kopplade enheter. Koppling gjordes till en början med Husmann-enheter för aktiverat slam men har också gjorts med Porous Pot-enheter (2) (3). Inga betydande skillnader i resultat erhöles mellan icke-kopplade och kopplade enheter (Husmann eller Porous Pots) och det är därför onödigt att använda tid och resurser på koppling av enheter.

Utbyte av slam kan ge bilden av rätt betydande eliminering, eftersom en del av testkemikalien överförs och koncentrationen av testkemikalie i test- och kontrollutflödena blir nästan densamma. Därför måste korrigeringsfaktorer användas, vilka är beroende av den fraktion som utbyts och den genomsnittliga hydrauliska retentionstiden. Närmare detaljer om beräkningen har publicerats (1).

Beräkna den korrigerade DOC- eller COD-elimineringsgrader med användning av följande allmänna formel:

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

där

D_{tc} = korrigerad procentuell DOC- eller COD-eliminering,

D_t = fastställd procentuell DOC- eller COD-eliminering,

a = utbytesfraktion av volymen i enheterna för aktiverat slam,

r = genomsnittlig hydraulisk retentionstid (tim).

Om t.ex. hälften av volymen i luftningskärlet byts ut ($a = 0,5$) och den genomsnittliga hydrauliska retentionstiden är 6 timmar, är den korrekta formeln följande:

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

LITTERATUR

- (1) Fischer W., Gerike P., Holtmann W (1975), "Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test", *Wat. Res.* 9, s. 1131–1135.
- (2) Painter H. A. och Bealing D. J. (1989), "Experience and data from the OECD Activated Sludge Simulation Test", s. 113–138, ingår i *Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18*, Red. Jacobsen B. N., Muntau H., Angeletti G.
- (3) Painter H. A., King E. F. (1978), "Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability", Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

Tillägg 4

UTVÄRDERING AV INHIBERING AV AKTIVERAT SLAM

Förfarande med testkemikalier

1. En kemikalie (eller ett avloppsvatten) bryts eventuellt inte ned eller elimineras i simuleringstest och kan t.o.m. ha en inhiberande effekt på slammets mikroorganismer. Övriga kemikalier är biologisk nedbrytbara i låga koncentrationer men har inhiberande verkan i högre koncentrationer (hormesis). Inhiberande effekter har kanske framkommit på ett tidigare skede eller kan bestämmas med hjälp av toxicitetstest, med användning av liknande eller identiskt inokulat som används vid simuleringstest (1). Sådana metoder är inhibering av syreupptagning (kapitel C.11 i denna bilaga (2) och ISO 8192 (3)) eller inhibering av tillväxt av mikroorganismer i aktiverat slam (ISO 15522 (4)).
2. Vid simuleringstest framgår inhibering genom att skillnaden mellan upplöst organiskt kol (DOC) eller kemisk syreförbrukning (COD) mellan utflödet från testkärlet och utflödet från kontrollkärlet är större än det DOC som tillsatts i form av testkemikalie. Detta kan även uttryckas som att den procentuella elimineringen av DOC (och biokemisk syreförbrukning BOD, kemisk syreförbrukning COD och/eller NH_4^+) i det organiska mediet minskar när testkemikalie har tillsatts. Om detta inträffar bör testet upprepas med lägre koncentration av testkemikalien tills man når en nivå där ingen inhibering inträffar och därefter eventuellt ytterligare sänka koncentrationen tills testkemikalien har brutits ned biologiskt. Om däremot testkemikalien (eller avloppsvattnet) påverkar processen negativt vid alla testade koncentrationer, tyder detta på att kemikalien är svår eller omöjlig att behandla biologiskt, även om det kan vara värt att upprepa testet med aktiverat slam från en annan källa och/eller låta slammet aklimatisera sig mer gradvis.
3. Omvänt gäller att om testkemikalien bryts ned biologiskt vid första försöket i ett simuleringstest bör koncentrationen ökas, om det är nödvändigt att få information om huruvida kemikalien fungerar inhiberande.
4. Vid bestämning av inhiberingsgraden bör man komma ihåg att populationen i det aktiverade slammet kan ändras så att mikroorganismerna med tiden utvecklar tolerans mot en inhiberande kemikalie.
5. Beräkning av inhiberingsgraden:

Den totala procentuella elimineringen R_o , av BOD, DOC, COD osv. för test- och kontrollkärlet kan beräknas genom följande:

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

där:

I = inflödeskoncentrationen för BOD, DOC, COD osv. för test- eller kontrollkärlet (mg/l),
E = respektive utflödeskoncentrationer (mg/l).

I och E måste korrigeras för DOC på grund av testkemikalien i testkärlet, annars får man inte rätt resultat från beräkningen av procentuell inhibering.

Graden av inhibering orsakad av testkemikalien kan beräknas genom följande:

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

där:

R_c = procentuell eliminering i kontrollkärlet,
 R_t = procentuell eliminering i testkärlet.

LITTERATUR

- (1) Reynolds L. m.fl. 1987, "Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability", *Chemosphere* 16: 2259.
- (2) Kapitel C.11 i denna bilaga, Biologisk nedbrytbarhet – Aktiverat slam – respirationshämningstest.
- (3) ISO 8192 (2007), Water quality - Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.
- (4) ISO 15522 (1999), Water Quality - Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

Tillägg 5

Dåligt vattenlösliga kemikalier, flyktiga kemikalier**Dåligt vattenlösliga kemikalier**

Det verkar finnas få publicerade rapporter rörande test som simulerar vattenrening och omfattar kemikalier med dålig eller ingen löslighet i vatten (1) (2) (3).

Det finns ingen enskild metod för dispergering av testkemikalie som kan tillämpas på alla olösliga kemikalier. Två av de fyra typer av metoder som beskrivs i ISO 10634 (4) verkar vara lämpliga för att dispergera testkemikalier för simulerings-test – användning av emulgeringsmedel och/eller ultraljud. Den resulterande dispersionens stabilitet bör fastställas under minst 24 timmar. Lämpligt stabiliserade dispersioner i en behållare med kontinuerlig omrörning (punkt 38) kan därefter doseras till luftningskärlet separat från avloppsvatten från hushåll (eller syntetiskt avloppsvatten).

Om en dispersion är stabil bör man undersöka hur testkemikalien kan bestämmas i den dispergerade formen. Det är sannolikt inte lämpligt med DOC, vilket betyder att en specifik analysmetod för testkemikalien bör etableras som kan användas på utflöde, utflödets fasta ämnen och aktiverat slam. Därefter fastställs vad som händer med testkemikalien vid simulering av aktivslamprocessen, i vätskeform och fast form. Då kan en "massbalans" etableras för att fastställa huruvida det har skett biologisk nedbrytning av testkemikalien. Detta ger dock endast indikation på primär biologisk nedbrytning. Man bör försöka demonstrera slutlig biologisk nedbrytning genom att tillämpa respirometritest för lätt bionedbrytbarhet (kapitel C.4 i denna bilaga (5) C, F eller D) med inokulat i form av slam som exponerats för testkemikalien i simulerings-testet.

Flyktiga kemikalier

Simulering av avloppsvattenrening på flyktiga kemikalier är både diskutabelt och problematiskt. På samma sätt som för dåligt vattenlösliga testkemikalier tycks det även för flyktiga kemikalier ha publicerats mycket få rapporter som beskriver simulerings-test. En konventionell typ av apparatur för fullständig blandning kan anpassas genom att försegla luftnings- och sedimenteringskärlen, och därefter mäta och kontrollera luftflödet med flödesmätare och låta utloppsgasen passera genom fällor för uppsamling av flyktigt organiskt material. I vissa fall används vakuumpump för att dra utloppsgasen genom en "kall" fälla eller purge-trap som innehåller Tenax och silikagel för gaskromatografianalyser. Testkemikalien i fällan kan bestämmas analytiskt.

Testet genomförs i två delar. Först körs enheterna utan slam men med syntetiskt avloppsvatten plus testkemikalie som pumpas in i luftningskärlet. Prover tas av inflöde, utflöde och utloppsgas och analyseras för testkemikalien under några dagar. Utifrån insamlade data kan procentandelen testkemikalie (R_{vs}) som strippats ur systemet beräknas.

Därefter genomförs normalt biologiskt test (med slam) under liknande förhållanden som använts vid strippningen. Likaså mäts DOC eller COD för att kontrollera att enheterna fungerar effektivt. Mängden testkemikalie i inflöde, utflöde och utloppsgas bestäms då och då under testets första fas, och efter aklimatiseringen mer frekvent. Utifrån de data som fås under steady state kan procentandelen eliminerad testkemikalie från vätskefasen i alla processer (R_T) (fysisk och biologisk eliminering) beräknas, såväl som andelen (R_V) som strippats från systemet.

Beräkning:

a) Vid icke-biologiskt test kan procentandelen (R_{VP}) testmaterial som strippats från systemet beräknas genom följande:

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

där

R_{VP} = eliminering av testkemikalie genom avdunstning (%),

S_{VP} = testkemikalie som uppsamlats i en fälla, uttryckt som ekvivalent koncentration i vätskefasen (mg/l),

S_{IP} = testkemikalien koncentration i inflödet (mg/l).

b) Vid biologiskt test kan procentandelen (R_V) testmaterial som strippats från systemet beräknas genom följande:

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

där

R_V = eliminering av testkemikalie genom avdunstning i biologiskt test (%),

S_V = testkemikalie som uppsamlats i en fälla i biologiskt test, uttryckt som ekvivalent koncentration i vätskeformigt inflöde (mg/l),

S_I = testkemikalien koncentration i inflödet (mg/l).

- c) Vid biologiskt test beräknas procentandelen testkemikalie (R_T) som eliminerats genom alla processer genom följande:

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

där

S_E = koncentrationen testkemikalie i (vätskeformigt) utflöde (mg/l).

- d) Då kan procentandelen (R_{BA}) som eliminerats genom bionedbrytning plus adsorption beräknas genom följande:

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

Separata test bör göras för att fastställa om testkemikalien har adsorberats och i så fall kan ytterligare korrigering göras.

- e) En jämförelse mellan andelen testkemikalie som strippats från systemen för biologiskt test (R_V) och icke-biologiskt test (R_{VP}) indikerar den totala effekt som den biologiska behandlingen har haft på utsläpp av testkemikalien i atmosfären.

Exempel: Bensen

Slamretentionstid = 4 dagar

Syntetiskt slam, retentionstid 8 timmar

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

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

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

$$S_E = 50 \text{ } \mu\text{g/l}$$

Således,

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

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

Det antas att bensen inte adsorberas på slammet.

LITTERATUR

- (1) Horn J. A., Moyer J. E., Hale J.H. (1970), "Biological degradation of tertiary butyl alcohol", Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ., s. 939–854.
- (2) Pitter P., Chudoba J. (1990), "Biodegradability of organic substances in the aquatic environment", CRC Press, Boston, Förenta staterna.
- (3) Stover E. L., Kincannon D. F. (1983), "Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters", *J. Wat. Pollut. Control Fed.* 55, 97,
- (4) ISO 10634 (1995), *Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.*
- (5) Kapitel C.4 i denna bilaga, Bestämning av "lätt" bionedbrytbarhet.

Tillägg 6

Slamretentionstidens (SRT) inverkan på reningsmöjligheterna för en kemikalie

INLEDNING

1. Den metod som beskrivs i huvudtexten syftar till att fastställa om de kemikalier som testas (i regel kemikalier som veterligen är inherent, men inte lätt, bionedbrytbara) kan brytas ned biologiskt inom de gränser som gäller i avlopprensingsverk. Resultaten uttrycks som procentandel eliminering och procentandel biologisk nedbrytning. Driftsbetingelserna i aktivslamenheterna och valet av inflöde kan ge rätt stora variationer vad gäller koncentrationen av testkemikalie i utflödet. Testerna genomförs vanligen med endast en nominell koncentration av fasta ämnen i slammet eller en nominell slamretentionstid (SRT) och de beskrivna systemen för slamkassering kan leda till att SRT-värdet varierar betydligt under testet, både från dag till dag och under en dag.
2. I denna variant (1) (2) kontrolleras SRT med mycket snävare gränser under varje 24-timmarsperiod (på samma sätt som i full skala), vilket ger en mer konstant koncentration i utflödena. Avloppsvatten från hushåll rekommenderas eftersom det ger enhetligare och högre procentandel eliminering. Dessutom undersöks verkningarna av ett antal SRT-värden och i en mer detaljerad studie kan verkningarna av ett urval temperaturer på utflödeskoncentrationen fastställas.
3. Det finns fortfarande inget allmänt samförstånd om vilken kinetisk modell som gäller när kemikalier bryts ned biologiskt under de förhållanden som råder vid avloppsvattenrening. Monod-modellen för bakteriell tillväxt och substratanvändning valdes (1) (2) för behandling av insamlade data, eftersom metoden endast var avsedd att tillämpas på kemikalier tillverkade i stora volymer som leder till en koncentration över 1 mg/l i avloppsvattnet. Den förenklade modellens giltighet och de antaganden som gjordes fastställdes genom användning av en serie alkoholetoxylat med varierande grader av primär bionedbrytbarhet (2) (3).

Anmärkning: Denna metodvariant påminner mycket om testmetod C.10-A och nedan anges endast de detaljer som avviker.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

4. Porous Pot-enheter för aktiverat slam utformade för att ge (nästan) kontinuerlig kassering av blandad vätska, vilket möjliggör en mycket exakt kontroll av slamretentionstiden (SRT eller θ_d), körs i icke-kopplat läge med ett urval olika slamretentionstider och, alternativt, med ett urval olika temperaturer. Retentionstiden är i regel 2–10 dagar och temperaturen mellan 5 och 20 °C. Avloppsvattnet, helst från hushåll, och en lösning av testkemikalien doseras separat till enheterna med ett flöde som ger den önskade retentionstiden (3–6 timmar) och önskad koncentration av testkemikalien i inflödet. Kontrollenheter som inte matas med testkemikalie körs parallellt för jämförande ändamål.
5. Olika typer av apparatur kan användas, men stor vikt bör fästas vid att säkerställa god kontroll av slamretentionstiden. Om den utrustning som används t.ex. innehåller ett sedimenteringskär, kan det vara nödvändigt att räkna med förlust av fasta ämnen via utflödet. Dessutom bör speciella försiktighetsmått vidtas för att undvika fel på grund av variationer av mängden slam i sedimenteringskärlet.
6. Enheterna körs vid var och en av de olika betingelser som har valts, och efter att jämvikt har nåtts fås genomsnittliga steady state-koncentrationer av testkemikalie i utflödena, och alternativt DOC, under en period som omfattar cirka tre veckor. Utöver bedömning av procentandelen eliminering för testkemikalie, och alternativt DOC, fås förhållandet mellan driftsbetingelserna och koncentrationen i utflödet uttryckt i grafisk form. Utifrån detta kan preliminära kinetiska konstanter beräknas och prognoser för de betingelser under vilka testkemikalien kan behandlas.

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

7. Se kapitel C.10 A, punkterna 12 och 13.

GODKÄNNANDENIVÅER

8. Se kapitel C.10 A, punkterna 14 och 15.

REFERENSKEMIKALIE

9. Se kapitel C.10 A, punkt 16.

TESTRESULTATENS REPRODUCERBARHET

10. Se kapitel C.10 A, punkterna 17 och 18.

METODBESKRIVNING

Apparatur

11. Lämplig enhet är ett modifierat Porous Pot-system (tillägg 6.1). Det består av ett inre kärl konstruerat av poröst polypropen med tjocklek på 3,2 mm och porstorlek på cirka 90 μm , med stumsvetsad söm (detta ger en robustare enhet än den som beskrivs i punkt 21 i detta kapitel C.10 A). Innerkärlet omsluts av ett ogenomträngligt ytterkärl av polyetylen som består av två delar: en rund bas med hål för två luftkanaler och en slamkasseringskanal, och en övre cylinder som är skruvad på basen och vars utlopp är placerat så att Porous Pot-kärlet får en känd volym på 3 liter. En av luftkanalerna har en diffusör och den andra är öppen och placerad i rät vinkel till diffusörens utlopp. Detta system ger den turbulens som krävs för att säkerställa att innehållet blandas fullständigt och att koncentrationerna av löst syre hålls över 2 mg/l.
12. Lämpligt antal enheter hålls vid kontrollerad temperatur mellan 5 och 20 °C (± 1 °C), antingen i vattenbad eller i utrymmen med konstant temperatur. Pumpar krävs för att dosera lösning av testkemikalie och sedimenterat avloppsvatten med önskat flöde (0–1,0 ml/min och 0–25 ml/min) och en tredje pump för att avlägsna överloppsslam från luftningskärlen. Den mycket låga flödeshastighet som krävs för överskottsslam nås genom att använda en pump ställd på högre flödeshastighet som körs intermittent med hjälp av en timer, t.ex. 10 sekunder per minut, så att en pumpinställning på 3 ml/min ger ett flöde på 0,5 ml/min.

Filtreringsapparatur eller centrifug

13. Se kapitel C.10 A, punkt 23.

Analysutrustning

14. Se kapitel C.10 A, punkt 24.

Vatten

15. Se kapitel C.10 A, punkterna 25 och 26.

Organiskt medium

16. Se kapitel C.10 A, punkt 27.

Syntetiskt slam

17. Se kapitel C.10 A, punkt 28.

Avloppsvatten från hushåll

18. Se kapitel C.10 A, punkt 29.

Aktiverat slam

19. Se kapitel C.10 A, punkt 30.

Stamlösningar av testkemikalien

20. Se kapitel C.10 A, punkterna 31 och 32.

FÖRFARANDE

Förberedning av inokulat

21. Se kapitel C.10 A, punkt 34 (endast denna gäller) – använd aktiverat slam (cirka 2,5 g/l).

Antal testenheter

22. För ett enkelt test, dvs. för att mäta procentandelen eliminering, behövs bara en slamretentionstid (SRT). För att få de data som behövs för beräkning av preliminära kinetiska konstanter behövs däremot 4 eller 5 SRT-värden. Vanligen används retentionstider mellan 2 och 10 dagar. Det är i regel praktiskt att göra ett test med 4 eller 5 SRT-värden samtidigt vid en och samma temperatur. I mer omfattande studier kan samma SRT-värden, eller eventuellt ett annat

urval värden, användas vid andra temperaturer inom området 5–20 °C. För primär bionedbrytning (huvudändamål) behövs i regel bara en enhet per uppsättning testbetingelser. Vid test av slutlig bionedbrytbarhet behövs dock en kontrollenhet för varje uppsättning testbetingelser; denna matas med enbart slam, inte testkemikalie. Om man tror att det finns testkemikalie i det slam som används, är det nödvändigt att använda kontrollenheter vid bedömning av primär biologisk nedbrytning och därefter göra nödvändiga korrigeringar i beräkningarna.

Dosering av organiskt medium och testkemikalie

23. Se kapitel C.10 A, punkterna 36–39, men notera att testkemikalielösningen doseras separat och att flera olika slamkasseringsgrader används. Det behövs också regelbunden övervakning (t.ex. två gånger om dagen) och vid behov justering, inom $\pm 10\%$, av flödes hastigheterna för inflöden, utflöden och slamkassering. Om det uppstår svårigheter med analysmetoden när avloppsvatten från hushåll används, kan testet genomföras med syntetiskt avloppsvatten, men då måste man se till att olika media ger jämförbara kinetiska data.

Hantering av enheterna för aktiverat slam

24. Se kapitel C.10 A, punkterna 40–43, men SRT ska endast kontrolleras genom "konstant" kassering av slam.

Provtagning och analys

25. Se kapitel C.10 A, punkterna 44–50, med undantag för att testkemikalien koncentration måste bestämmas och bestämning av DOC är frivillig. COD ska inte användas.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

26. Se kapitel C.10 A, punkterna 52–54.

Presentation av testresultat

27. Se kapitel C.10 A, punkterna 56–62.

Beräkning av kinetiska konstanter

28. Det är mera realistiskt att ange genomsnittlig steady state-koncentration av testkemikalien i utflödet och beskriva hur denna varierar enligt driftsbetingelserna än att ange procentuell primär bionedbrytning. Detta kan göras genom att beakta ekvation 6 i tillägg 6.2 som kan ge värden för K_S , μ_m och ϑ_{SC} , den kritiska slamretentionstiden.

(Alternativt kan ungefärliga värden för K_S och μ_m fås med hjälp av ett enkelt datorprogram för att anpassa den teoretiska kurvan som beräknats med ekvation 2 (tillägg 6.2) till de experimentella värdena. Även om ingen given lösning är unik, går det att få en rimlig approximering av K_S och μ_m .)

Resultatvariation

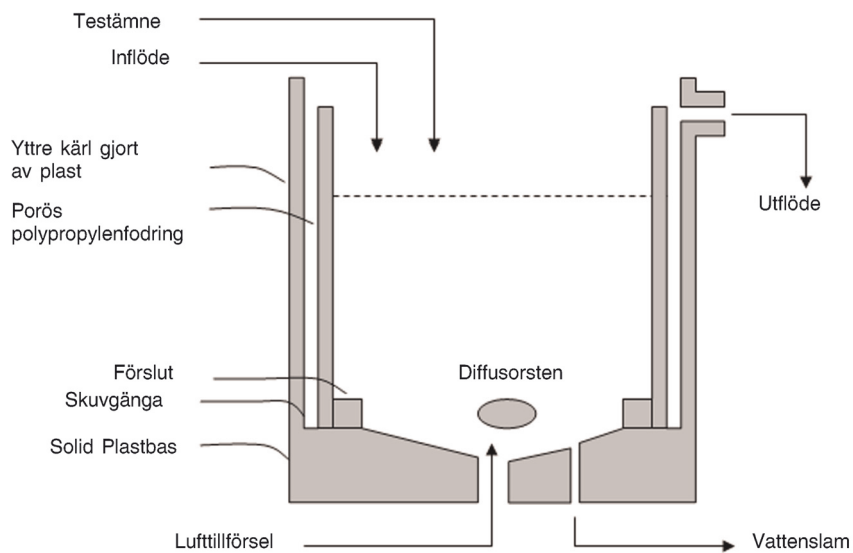
29. Den vanliga erfarenheten är att man får varierande värden för de kinetiska parametrarna för individuella kemikalier. Man tror att slammets odlingsbetingelser och de betingelser som gäller i det test som används (som i punkt 5 och i andra test) har en stor effekt på de värden som erhålls. En aspekt av denna variation har diskuterats av Grady m.fl. (4) som har föreslagit att termerna "extant" and "intrinsic" ska användas för de två extrema betingelser som representerar gränserna för den fysiologiska status som en odling kan ha under ett kinetiskt experiment. Om odlingens status inte tillåts variera under testet, återspeglar de kinetiska parametervärdena betingelserna i den miljö från vilken mikroorganismerna har tagits – för dessa värden används benämningen "extant", dvs. något som fortsatt existerar. Vid den andra yttersta gränsen är testbetingelserna sådana att de medger full utveckling av proteinsyntessystemet och därmed möjlighet till största möjliga tillväxt, och då används benämningen "intrinsic" för de kinetiska parametrar som erhålls, dvs. de är endast beroende av substratets karaktär och typen av bakterier i odlingen. Som riktlinje kan sägas att "extant"-värden fås när förhållandet mellan substratets koncentration och kompetenta mikroorganismer (S_0/X_0) hålls lågt, t.ex. 0,025, och "intrinsic"-värden fås när förhållandet är högt, t.ex. minst 20. I båda fallen gör S_0 bör vara samma eller högre än det relevanta värdet för K_S , halvmättnadskonstanten.
30. Variationen och andra aspekter rörande bionedbrytningens kinetik diskuterades nyligen vid en SETAC-workshop (5). Dessa studier, rapporterade och projekterade, bör ge en klarare uppfattning om den kinetik som fungerar i vattenretningsverk, och därmed en bättre tolkning av befintliga data och förslag till mer relevanta utformningar av nya testmetoder.

LITTERATUR:

- (1) Birch R. R. (1982), "The biodegradability of alcohol ethoxylates", XIII Jornado Com. Espanol Deterg., s. 33–48.
 - (2) Birch R. R. (1984), "Biodegradation of nonionic surfactants", *J.A.O.C.S.*, 61(2), s. 340–343.
 - (3) Birch R. R. (1991), "Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment", *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 50, s. 411–422.
 - (4) Grady C. P. L., Smets B. F. och Barbeau D. S. (1996), "Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology", *Wat. Res.*, 30 (3), s. 742–748.
 - (5) "Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997)", Workshop at Port Sunlight, UK, red. Hales S. G., Feitjel T., King H., Fox K., Verstraete W., 4–6 september 1996. SETAC Europe, Bryssel.
-

Tillägg 6.1

Porous Pot med SRT-kontroll



Tillägg 6.2

Beräkning av kinetiska konstanter

1. Utifrån antagandet att Monod-kinetik kan tillämpas och med beaktande av en massbalans av aktiva fasta ämnen och substrat över systemet med aktiverat slam (1), kan man få steady state-uttryck enligt följande:

$$\text{eller} \quad \frac{1}{\vartheta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \quad (1)$$

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

S_1 = koncentrationen substrat i utflödet (mg/l)

K_s = halvmättnadskonstant, den koncentration vid vilken $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = specifik tillväxthastighet (d^{-1})

μ_m = maximivärde för μ_m (d^{-1})

K_d = specifik sönderfallshastighet för aktiva fasta ämnen (d^{-1})

ϑ_s = slammets medelretentionstid, SRT (d)

Undersökning av denna ekvation leder till följande slutsatser:

- i) Koncentrationen i utflödet är oberoende av koncentrationen i inflödet (S_0); således varierar den procentuella bionedbrytningen enligt koncentrationen i inflödet S_0 .
- ii) Den enda anläggningskontrollparameter som påverkar S_1 är slamretentionstiden ϑ_s .
- iii) För en given koncentration i inflödet, S_0 , finns det en kritisk slamretentionstid, dvs.

$$\text{där} \quad \frac{1}{\vartheta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \quad (3)$$

ϑ_{SC} = kritisk slamretentionstid, under vilken de kompetenta mikroorganismerna sköljs ut ur anläggningen.

- iv) Eftersom de övriga parametrarna i ekvation (2) är associerade med tillväxtkinetik, är det sannolikt att temperaturen påverkar utflödets substratnivå och den kritiska slamåldern, dvs. den slamretentionstid som behövs för att få en viss grad av rening ökar med sjunkande temperatur.

2. Utifrån en massbalans för fasta ämnen i Porous Pot-systemet och utifrån antagandet att koncentrationen fasta ämnen i anläggningens utflöde X_2 är lågt i jämförelse med luftningskärlets utflöde X_1 , är slamretentionstiden

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

där

V = luftningskärlets volym (l)

X_1 = koncentrationen fasta ämnen i luftningskärlet (mg/l)

X_2 = koncentrationen fasta ämnen i utflödet (mg/l)

Q_0 = inflödets flödes hastighet (l/d)

Q_1 = avloppsslammets flödes hastighet (l/d)

Det är således möjligt att hålla slamretentionstiden på ett förhandsvalt värde genom att kontrollera avloppsslammets flödes hastighet Q_1 .

Slutsatser:

- Huvudsyftet med detta test är alltså att kunna förutse testkemikaliens koncentration i utflödet, och därmed testkemikaliens nivåer i vattenrecipienten.
- Genom att plotta S_1 mot ϑ_s kan den kritiska slamretentionstiden ϑ_{SC} i vissa fall uppskattas på enkelt sätt, se t.ex. kurva 3 i figur 1. Om detta inte är möjligt kan ϑ_{SC} beräknas med ungefärliga värden på μ_m och K_s genom att plotta S_1 mot $S_1 \cdot \vartheta_s$.

Omordning av ekvation 1 ger följande:

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

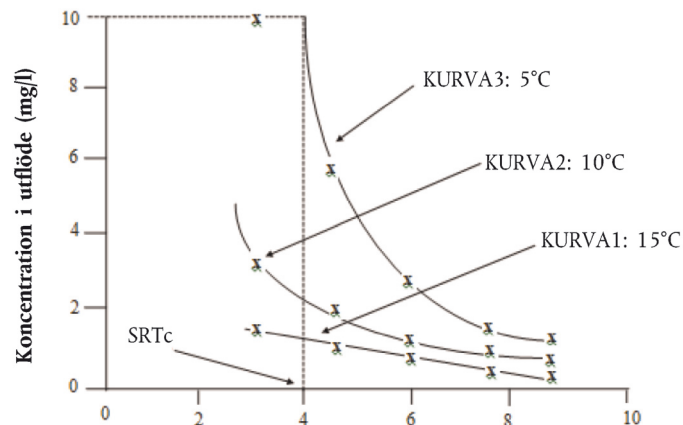
Om K_d är lågt blir $1 + \vartheta_s \cdot K_d \sim 1$ och ekvation 5 blir enligt följande:

$$S_1 \cdot \vartheta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad (6)$$

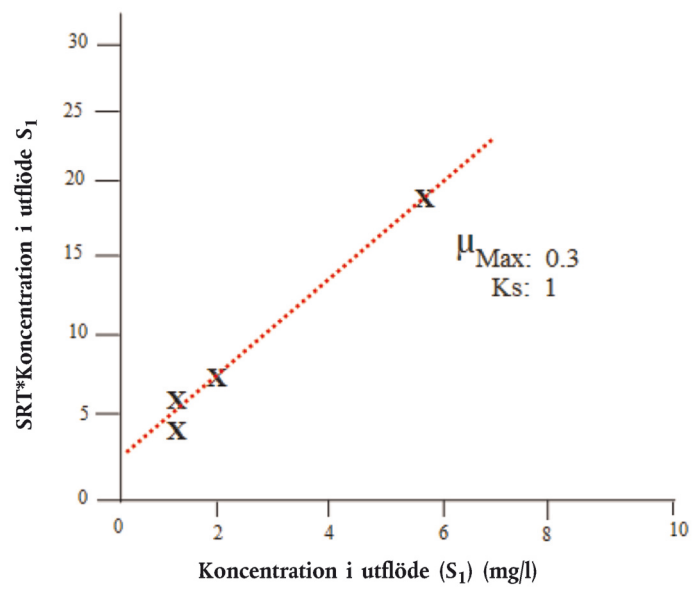
Då bör kurvan bli en rak linje (se figur 2) som har lutningen $1/\mu_m$ och skärningspunkt med K_s/μ_m ; likaså är $\vartheta_s \sim 1/\mu_m$.

Figur 1

Tre temperaturer, fem SRT-värden



Figur 2

Regressionslinje $SRT \cdot S_1$ mot S_1 vid $T = 5^\circ\text{C}$ 

Ordlista:

Koncentration i utflöde

Kurva

Tillägg 7

TEST VID LÅGA ($\mu\text{g/l}$) KONCENTRATIONER

1. Kemikalierna i vattenmiljön förekommer ofta i mycket låga koncentrationer ($\mu\text{g/l}$), även i avloppsvatten. Vid sådana koncentrationer fungerar de sannolikt inte som primära substrat som resulterar i tillväxt, utan sönderfaller mer sannolikt som icke-växande sekundära substrat, parallellt med förekomsten av flera olika naturligt förekommande kolföreningar. Av det följer att sönderfallet av sådana kemikalier inte följer modellen som beskrivs i tillägg 6. Det finns flera modeller som kan tillämpas och under de betingelser som råder i system för rening av avloppsvatten kan flera modeller vara samtidigt aktiva. Det kommer att behövas en hel del mera forskning för att få klarhet i detta problem.
2. Fram till dess kan förfarandet som beskrivs i huvudtexten (kapitel C.10 A) följas, men endast för primär bionedbrytbarhet, med användning av lämpligt låga koncentrationer ($< 100 \mu\text{g/l}$) och ett validerat analysförfarande. Den procentuella bionedbrytningen kan beräknas (se punkt 54 i testmetoden) förutsatt att de abiotiska processerna (adsorption, flyktighet osv.) beaktas. Som exempel kan nämnas en studie gjord av Nyholm m.fl. (1) (2) med användning av en 4-timmarscykel i ett fill and draw-system. De rapporterade pseudo-första ordningens konstanter för 5 kemikalier som tillsatts till syntetiskt avloppsvatten i koncentrationer på 5–100 $\mu\text{g/l}$. För slutlig bionedbrytbarhet kan ^{14}C -märkta kemikalier användas. Beskrivning av detta går utöver räckvidden för denna testmetod eftersom det än så länge inte finns överenskomna förfaranden, om än en föreslagen metod för ISO 14592 (3) innehåller vägledning om användningen av ^{14}C -märkta kemikalier.

SCAS-test

3. Senare föreslogs ett enklare tvåstegstest (4) (5) (6) där SCAS-metoden (Semi Continuous Activated Sludge) följs av ett kortvarigt kinetiskt test på prover tagna från SCAS-enheterna. SCAS-systemet körs med kända slamkasseringsgrader (till åtskillnad från den ursprungliga C.12-testmetoden) och matas med modifierat syntetiskt avloppsvatten eller avloppsvatten från hushåll. Det syntetiska avloppsvattnet modifierades (på grund av föränderligt pH-värde och slamrets dåliga sedimentering) genom tillsats av fosfat som buffert, jästextrakt, järn(III)klorid och spårelementsalter, och COD höjdes till cirka 750 mg/l genom ökad koncentration av pepton och köttextrakt. Enheterna kördes med en 24-timmarscykel: luftning under 23 timmar, kassering av slam, sedimentering, borttagning av supernatant (utflöde) och därefter tillsats av syntetiskt avloppsvatten plus testkemikalie, upp till $\mu\text{g/l}$ (dvs. ungefär samma koncentration som användes i korttidstestet). En gång i veckan ersattes 10 % av totalslammet med färskt slam för att upprätthålla balans i den mikrobiella populationen.
4. Koncentrationen av testkemikalie i början och i slutet av luftningen uppmäts och testet fortsätts tills en konstant eliminering av testkemikalie erhålls, vilket tar från en vecka till flera månader.

Korttidstest

5. Ett korttidstest (t.ex. 8 timmar) används för att bestämma (pseudo) första ordningens kinetiska konstant för sönderfall av testkemikalien i aktiverat slam med kända men olika ursprung och olika historia. Slamprover tas särskilt från SCAS-reaktorer – i slutet av luftningsperioden när koncentrationen organiskt substrat är låg – medan acklimatiseringsexperiment pågår (punkterna 3, 4). För jämförelse kan slam också tas från en parallell SCAS-enhet som inte exponeras för testkemikalie. Blandningar av slam och testkemikalie tillsatta i två eller flera koncentrationer i området 1–50 $\mu\text{g/l}$ luftas, utan tillsats av syntetiskt avloppsvatten eller annat organiskt substrat. Kvarvarande testkemikalie i lösningen bestäms med regelbundna mellanrum, t.ex. varje timme, beroende på kemikalins sönderfallsegenskaper, under högst 24 timmar. Proverna centrifugeras före själva analysen.

Beräkningar

6. Data från SCAS-enheterna används för att beräkna procentandelen eliminerad testkemikalie (punkt 54). Likaså kan en konstant för genomsnittlig eliminering K_1 (normaliserad för koncentrationen suspenderade fasta ämnen) kalkyleras genom följande:

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

där

t = luftningstiden (23 timmar)

C_e = koncentrationen vid luftningsperiodens slut ($\mu\text{g/l}$)

C_i = koncentrationen vid luftningsperiodens början ($\mu\text{g/l}$)

SS = koncentrationen av fasta ämnen i aktiverat slam (g/l)

7. För korttidstestet plottas logaritmen av procentuell återstående koncentration mot tiden och lutningen på den första delen (10–50 % sönderfall) av grafen motsvarar K_1 , (pseudo)första ordningens konstant. Konstanten normaliseras med hänsyn till koncentrationen fasta ämnen i slammet genom att dividera lutningen med koncentrationen fasta ämnen i slammet. De rapporterade resultaten måste också innehålla uppgifter om initialkoncentrationen för testkemikalie och suspenderade fasta ämnen, slamretentionstiden, slammatning och slamkälla samt uppgifter om eventuell förhands-exponering för testkemikalien.

Resultatvariation

8. Variationen och andra aspekter rörande bionedbrytningens kinetik diskuterades nyligen vid en SETAC-workshop (7). Dessa studier bör, rapporterade och projekterade, ge en klarare uppfattning om den kinetik som fungerar i vattenreningsverk, och därmed en bättre tolkning av befintliga data och förslag till mer relevanta utformningar av nya testmetoder.

LITTERATUR

- (1) Nyholm N., Jacobsen B. N., Pedersen B. M., Poulsen O., Dambourg A. och Schultz B. (1992), "Removal of micro-pollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability", *Wat. Res.* 26, s. 339–353.
- (2) Jacobsen B.N., Nyholm N., Pedersen B.M., Poulsen O. och Ostfeldt P. (1993), "Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption", *Wat. Res.* 27, s. 1505–1510.
- (3) ISO 14592 (ISO/TC 147/ SC5/ WG4, N264) (1998), *Water Quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.*
- (4) Nyholm N., Ingerslev F., Berg U. T., Pedersen J. P. och Frimer-Larsen H. (1996), "Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations", *Chemosphere* 33 (5), s. 851–864.
- (5) Berg U. T. och Nyholm N. (1996), "Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations", *Chemosphere* 33 (4), s. 711–735.
- (6) Danish Environmental Protection Agency 1996), "Activated sludge biodegradability simulation test", Environmental Project, No. 337, Nyholm, N. Berg, UT, Ingerslev, F. Miljö- och energiministeriet, Köpenhamn.
- (7) "Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997)", Workshop at Port Sunlight, UK, Red. Hales S. G., Feitjel T., King H., Fox K. och Verstraete W., 4–6 september 1996, SETAC Europe, Bryssel.

C.10-B: Biofilmer

INLEDNING

1. Simuleringsstest används i regel på kemikalier som inte har klarat screeningstest för lätt bionedbrytbarhet (kapitel C.4 A till F i denna bilaga (9)) men som har klarat test för lätt bionedbrytbarhet. Undantagsvis används simuleringsstest också för kemikalier där det krävs mer information, särskilt storvolymkemikalier, och i regel används test med aktiverat slam (C.10 A). Under vissa omständigheter krävs det dock specifik information om hur en kemikalie agerar när reningsmetoderna inbegriper biofilm (biologiska filter eller bakteriefilter, roterande biologiska kontaktorer, fluidbädd). För att möta dessa behov har olika slags utrustning tagits fram.
2. Gerike m.fl. (1) använde stora bakteriefilter i pilotskala enligt kopplad modell. Filtrerna var mycket utrymmeskrävande och krävde relativt stora mängder avloppsvatten eller syntetiskt avloppsvatten. Truesdale m.fl. (2) beskrev små filter (6 fot × 6 tum i diameter) som matades med naturligt avloppsvatten fritt från ytaktiva ämnen men som fortfarande krävde rätt stora volymer. Det krävs upp till 14 veckor för utveckling av en "mogen" biofilm och ytterligare 4–8 veckor efter första tillförseln av det ytaktiva testämnet innan aklimatisering sker.
3. Baumann m.fl. (3) utvecklade ett betydligt mindre filter med polyesterfleece som först hade blötlagts i aktiverat slam såsom inert medium som underlag för biofilmen. Enda kolkälla var testkemikalien och bionedbrytbarheten bedömdes utifrån mätningar av upplöst organiskt kol (DOC) i inflöde och utflöde och utifrån mängden CO₂ i utloppsgasen.
4. Ett nytt sätt att närma sig frågan hade Gloyna m.fl. (4) som uppfann den roterande rörformiga reaktorn. På den inre ytan av ett roterande rör odlades en biofilm på känd ytareal genom passage av ett flöde som tillsattes i övre ändan av det svagt horisontellt lutande röret. Reaktorn har använts för att studera ytaktiva ämnens bionedbrytbarhet (5) samt för att undersöka biofilmens optimala tjocklek och diffusionen genom filmen (6). Gloyna m.fl. utvecklade reaktorn ytterligare, bl.a. genom att göra en modifikation som ger möjlighet att bestämma CO₂ i utloppsgasen.

5. Den roterande rörformiga reaktorn har antagits av Standing Committee of Analysts (UK) som en standardmetod för bedömning av både kemikaliers bionedbrytbarhet (7) och avloppsvattens behandlingsmöjlighet och toxicitet (8). Fördelarna med den metod som beskrivs här är att den är enkel, kompakt, reproducerbar och att det krävs relativt små volymer organiskt medium.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

6. Syntetiskt avloppsvatten eller avloppsvatten från hushåll, testkemikalien, i blandning eller för sig, appliceras på inre ytan av ett långsamt roterande lutande rör. Ett lager mikroorganismer, liknande dem som finns på biofiltermedia, byggs upp på den inre ytan. Reaktorns driftsbetingelser väljs så att man får adekvat eliminering av organiskt material och, om så krävs, oxidation av ammonium.
7. Utflödet från röret samlas upp och får antingen sedimentera och/eller filtreras före analys av upplöst organiskt kol (DOC) och/eller testkemikalien med en specifik metod. Som jämförelse körs kontrollenheter som inte matas med testkemikalie parallellt under samma betingelser. Skillnaden mellan koncentrationerna DOC i utflödet från test- och kontrollenheterna antas bero på testkemikalien och dess organiska metaboliter. Skillnaden jämförs med koncentrationen tillsatt testkemikalie (som DOC) i syfte att kunna beräkna elimineringen av testkemikalien.
8. I regel kan bionedbrytning åtskiljas från bioadsorption genom detaljerad granskning av kurvan för eliminering mot tid. Bekräftelse fås vanligen genom ett test för lätt bionedbrytbarhet (syreupptagning eller koldioxidproduktion) där man använder ett aklimatiserat inokulat som tas i slutet av testet från de reaktorer som matas med testkemikalien.

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

9. Testkemikalienens renhet, vattenlöslighet, flyktighet och adsorptionsegenskaper bör vara kända för att resultaten ska kunna tolkas korrekt.
10. I regel kan flyktiga och dåligt lösliga kemikalier inte testas om inte särskilda åtgärder vidtas (se tillägg 5 till kapitel C.10 A). Dessutom bör den kemiska strukturen eller minst den empiriska formeln vara känd för att kunna kalkylera teoretiska värden och/eller kontrollera uppmätta parametervärden, t.ex. teoretisk syreförbrukning (ThOD) och DOC.
11. Information om testkemikalienens toxicitet för mikroorganismer (se tillägg 4 till kapitel C.10 A) kan vara till hjälp för valet av lämpliga testkoncentrationer och kan även vara väsentlig för korrekt tolkning av låga värden för biologisk nedbrytbarhet.

GODKÄNNANDENIVÅER

12. Ursprungligen krävdes att den primära biologiska nedbrytningen av ytaktiva ämnen måste nå upp till minst 80 % för att kemikalien i fråga skulle få släppas ut på marknaden. Om 80 % eliminering inte uppnås, kan detta simuleringstest (bekräftande test) tillämpas, och det ytaktiva ämnet får endast släppas ut på marknaden förutsatt att mer än 90 % av kemikalien elimineras. Generellt gäller för kemikalier inte frågan om godkänt/ej godkänt, och värdet på den procentuella eliminering som erhållits kan användas i uppskattningsberäkningar av den sannolika miljökoncentration som kan användas vid farobedömning för kemikalier. I ett antal studier av rena kemikalier konstaterades att elimineringsprocenten för DOC var > 90 % i tre fjärdedelar av fallen och > 80 % i över 90 % av fallen för kemikalier som visade betydande grad av biologisk nedbrytbarhet.

REFERENSKEMIKALIER

13. För att säkerställa att försöksförfarandet genomförs korrekt är det lämpligt att med vissa mellanrum testa referenskemikalier med känt beteende. Sådana kemikalier är adipinsyra, 2-fenylfenol, 1-naftol, 2,2'-bifenyldikarboxylsyra och 1-naftoesyra.

TESTRESULTATENS REPRODUCERBARHET

14. Den relativa standardavvikelsen inom tester konstaterades i ett laboratorium i Storbritannien vara 3,5 % medan avvikelsen mellan test var 5 % (7).

METODBESKRIVNING

Apparatur

Roterande rörformiga reaktorer

15. Apparaturen (se figur 1 och 2 i tillägg 8) består av en grupp akrylrör med en längd på 30,5 cm och innerdiameter på 5 cm per rör, stödda på hjul med hjulring av gummi inom en stödring av metall. Varje rör har på utsidan en läpp med ett djup på cirka 0,5 cm för att hålla röret på hjulen, innerytan är uppruggad

med grov stålull och det finns en inre läpp med 0,5 cm djup vid övre ändan (inmatningsändan) för att hålla kvar vätskan. Rören har en horisontell lutning på cirka en grad för att få önskad kontakttid när testmediet appliceras i ett rent rör. De gummiklädda hjulens rotation drivs med en långsam motor med variabel hastighet. Rörets temperatur kontrolleras genom att det hålls i ett utrymme med konstant temperatur.

16. Genom att innesluta varje rörreaktor i ett aningen större rör med lock och säkerställa att anslutningarna är gastäta, kan utgående CO₂-gas samlas upp i en alkalisk lösning för efterföljande mätning (6).
17. För 24-timmarsmatning till varje teströr av organiskt medium med tillsatt testkemikalie, om tillämpligt, hålls mediet i ett 20-literskärl (A) (se figur 2). Om så krävs kan testkemikalielösningen doseras separat. Nära botten av varje lagringskärl finns ett utlopp som är kopplat med lämpliga rör, t.ex. av silikongummi, via en peristaltisk pump (B) till ett glas- eller akrylmatningsrör som går 2–4 cm in i den högre (inmatnings)ändan av det lutade röret (C). Utflödet får droppa ut från det lutade rörets lägre ända för uppsamling i ett annat lagringskärl (D). Utflödet sedimenteras eller filtreras före analys.

Filtreringsapparat, centrifug

18. Utrustning för filtrering av prover med membranfilter av lämplig porstorlek (nominell öppningsdiameter 0,45 µm) som adsorberar organiska kemikalier eller har minimalt utsläpp av organiskt kol. Om filter som släpper ut organiskt kol används, tvätta filtren försiktigt med hett vatten för att avlägsna detta kol. Alternativt kan man använda en centrifug som når upp till 40 000 m/s².
19. Analytisk utrustning för bestämning av

— DOC/totalt organiskt kol (TOC) eller kemisk syreförbrukning (COD),

— specifik kemikalie (HPLC, GC osv.), om så krävs,

— pH, temperatur, surhet, alkalinitet,

— ammonium, nitrit och nitrat, om testerna genomförs under nitrifikationsförhållanden.

Vatten

20. Kranvatten med mindre än 3 mg/l DOC.
21. Destillerat eller avjoniserat vatten med mindre än 2 mg/l DOC.

Organiskt medium

22. Syntetiskt avloppsvatten, avloppsvatten från hushåll eller en blandning av båda kan användas som organiskt medium. Det har visat sig att användning av enbart avloppsvatten från hushåll ofta ger ökad procentandel DOC-eliminering (i enheter för aktiverat slam) och t.o.m. möjliggör biologisk nedbrytning av vissa kemikalier som inte bryts ned när syntetiskt avloppsvatten enligt OECD används. Därför rekommenderas användning av avloppsvatten från hushåll. Mät DOC- eller COD-koncentrationen i varje ny sats av organiskt medium. Det organiska mediets surhet eller alkalinitet ska vara känd. Om mediet har låg surhet eller alkalinitet kan det krävas tillsats av lämplig buffert (natriumvätekarbonat eller kaliumvätefosfat) för att pH i reaktorn ska hållas kring 7,5 ± 0,5 under testet. Mängden buffert och tillsättningstidpunkten måste fastställas separat i varje enskilt fall.

Syntetiskt slam

23. Per liter kranvatten upplöses följande: 160 mg pepton, 110 mg köttextrakt, 30 mg urea, 28 mg vattenfritt dikaliumvätefosfat (K₂HPO₄), 7 mg natriumklorid (NaCl), 4 mg kalciumkloriddihydrat (CaCl₂·2H₂O), och 2 mg magnesiumsulfatheptahydrat (Mg₄SO₂·7H₂O). Detta syntetiska avloppsvatten enligt OECD är ett exempel, och ger en medelkoncentration på cirka 100 mg/l DOC i inflödet. Alternativt kan man använda andra sammansättningar med ungefär samma DOC-koncentration, som ligger närmare verkligt avloppsvatten. Detta syntetiska avloppsvatten kan göras i destillerat vatten i en koncentrerad form och förvaras i cirka 1 C upp till en vecka. Späd vid behov ut med kranvatten (detta medium är inte tillfredsställande, kvävekoncentrationen är t.ex. mycket hög och kolhalten relativt låg, men det finns inga bättre förslag utom att tillsätta mera fosfat som buffert samt extra pepton).

Avloppsvatten från hushåll

24. Använd färsk bottenavsatt av avloppsvatten som samlas upp dagligen från reningsanläggningar som i huvudsak tar emot avloppsvatten från hushåll. Avloppsvattnet ska samlas upp från primärsedimenteringstankens överflödeskanal eller från matningen till aktivslamanläggningen, och det ska till övervägande del vara fritt från grova partiklar. Avloppsvattnet kan användas efter ett antal dagars lagring vid cirka 4 °C, om det går att påvisa att DOC (eller COD) inte har sjunkit betydligt (mindre än 20 %) under lagringen. För att undvika systemstörningar ska DOC (eller COD) i varje ny sats justeras före användningen till ett lämpligt konstant värde, t.ex. genom utspädning med kranvatten.

Smörjmedel

25. Glycerol eller olivolja kan användas för smörjning av den peristaltiska pumpens rullar; båda är lämpliga för användning på silikongummirör.

Stamlösningar av testkemikalien

26. För kemikalier med rimlig löslighet bereds stamlösningar med lämpliga koncentrationer (t.ex. 1–5 g/l) i avjoniserat vatten eller i mineraldelen av syntetiskt avloppsvatten. För olösliga kemikalier, se tillägg 5 till kapitel C.10 A. Denna metod är inte lämplig för flyktiga kemikalier utan modifiering av de rörformade reaktorerna (punkt 16). Bestäm DOC och TOC för stamlösningen och upprepa mätningarna för varje ny sats. Om skillnaden mellan DOC och TOC är större än 20 % bör testkemikaliens vattenlöslighet kontrolleras. Jämför testkemikaliens DOC eller koncentration uppmätt genom specifik analys av stamlösningen med det nominella värdet, för att kunna bedöma om utbytet är tillräckligt bra (i regel kan > 90 % förväntas). Särskilt för dispersioner bör man försäkra sig om att DOC kan användas som analytisk parameter; annars måste en analysteknik som är specifik för testkemikalien användas. För dispersioner krävs centrifugering av proverna. För varje ny sats bör mätning göras av DOC, COD eller testkemikalien med specifik analys.
27. Bestäm stamlösningens pH. Extremvärden tyder på att tillsats av kemikalien kan påverka pH-värdet för det aktiverade slammet i testsystemet. I så fall bör stamlösningen neutraliseras till pH $7 \pm 0,5$ med små mängder organisk syra eller bas, men utfällning av testkemikalien bör undvikas.

FÖRFARANDE

Förberedning av organiskt medium för dosering

28. Se till att alla inflödes- och utflödesbehållare samt rören från inflödeskärl och till utflödeskärl rengörs omsorgsfullt för att eliminera mikrotillväxt initialt och under hela testet.
29. Förbered färskt syntetiskt avloppsvatten (punkt 23) varje dag, antingen från fasta ämnen eller från koncentrerad stamlösning genom lämplig utspädning med kranvatten. Mät upp den mängd som krävs i en cylinder och fyll på i ett rent inflödeskärl. Tillför vid behov också nödvändig mängd stamlösning av testkemikalie eller referenskemikalie till det syntetiska avloppsvattnet före utspädning. Om det är mera praktiskt eller nödvändigt för att undvika förlust av testkemikalien, förbered en separat utspädd lösning av testkemikalien i ett separat kärl och mata lösningen till de lutade rören via en skild doseringspump.
30. Alternativt (och helst) bör sedimenterat avloppsvatten från hushåll användas (punkt 24) som uppsamlats färskt varje dag, om möjligt.

Användning av de roterande rörformade reaktorerna

31. Två identiska rörformade reaktorer behövs för bedömning av en testkemikalie, och de monteras i ett utrymme med konstant temperatur, i regel 22 ± 2 °C.
32. Justera de peristaltiska pumparna på 250 ± 25 ml/tim organiskt medium (utan testkemikalie) till de lutade rören, som ska ha en rotation på 18 ± 2 rpm. Tillsätt smörjmedel (punkt 25) på pumpens rör (till en början och därefter regelbundet under testets gång) för att säkerställa korrekt funktion och förlänga rörens livslängd.
33. Justera rörens horisontella lutningsvinkel så att en uppehållstid på $125 \pm 12,5$ sekunder fås vid matning in i ett rent rör. Uppskatta retentionstiden genom att tillsätta en icke-biologisk markör (t.ex. NaCl, inert färgmedel) till matningen – den tid som krävs för att nå toppkoncentration i utflödet anses utgöra den genomsnittliga retentionstiden (när filmen är maximal kan retentionstiden öka till cirka 30 minuter).
34. Dessa parametrar har konstaterats ge adekvat eliminering (> 80 %) av DOC (eller COD) och producera nitrifierade utflöden. Flödes hastigheten bör ändras om elimineringen är otillräcklig eller om simuleringen gäller ett specifikt reningsverk. I det senare fallet bör doseringen av det organiska mediet justeras tills reaktorns prestanda är samma som för reningsverket.

Inokulering

35. Luftburen inokulering kan räcka för att starta tillväxt av mikroorganismer när syntetiskt avloppsvatten används; om så inte sker, tillsätt 1 ml/l sedimenterat avloppsvatten till matningen under 3 dagar.

Mätningar

36. Kontrollera regelbundet att doseringen och roteringshastigheterna ligger inom satta gränser. Mät också utflödets pH, särskilt om nitrifikation förväntas.

Provtagning och analys

37. Metod, mönster och frekvens väljs enligt testets ändamål. Ta t.ex. stickprov av inflöde och utflöde eller ta prover över en längre period, t.ex. 3–6 veckor. Under den första perioden, utan testkemikalie, tas prover två gånger i veckan. Filtrera proverna genom membraner eller centrifugera dem vid cirka 40 000 m/s² i cirka 15 minuter (punkt 18). Det kan vara nödvändigt att sedimentera och/eller grovfiltrera proverna före membranfiltrering. Bestäm DOC (eller COD) minst i duplikat och om så krävs BOD, ammonium och nitrit/nitrat.
38. Alla analyser bör göras så snart som möjligt efter provtagning och beredning av proverna. Om analyser måste senareläggas bör proverna förvaras vid cirka 4 C i mörker i helt fyllda och tätt förslutna flaskor. Om proverna måste förvaras längre än 48 timmar bör de konserveras genom djupfrysning, syrabehandling eller genom tillsats av lämpligt gift (t.ex. 20 ml/l av en 10 g/l-lösning av kvicksilver(II) klorid). Se till att konserveringstekniken inte påverkar analysresultaten.

Inkörningsperiod

39. Under inkörningsperioden växer ytans biofilm till optimal tjocklek, vilket i regel tar cirka 2 veckor men inte får överskrida 6 veckor. Elimineringen (punkt 44) av DOC (eller COD) ökar och når platåvärde. När platåvärdet har nått samma nivå i båda rören, väljs ena röret till kontrollrör för återstoden av testet, under vilken rören bör fungera på ett enhetligt sätt.

Tillsättning av testkemikalie

40. I detta skede tillsätts testkemikalie till den andra reaktorn i lämplig koncentration, i regel 10–20 mg C/l. Kontrollreaktorn matas fortsättningsvis endast med organiskt medium.

Acklimatiseringsperiod

41. Fortsätt med analyserna av DOC (eller COD) två gånger i veckan och om även primär bionedbrytbarhet ska bedömas, ska även en mätning av testkemikalien koncentration göras genom specifik analys. Låt acklimatiseringen pågå i 1–6 veckor (eller under speciella omständigheter längre) efter att testkemikalien tillsatts för första gången. När den procentuella elimineringen (punkterna 43–45) når ett maximivärde bestäms 12–15 giltiga värden från platåfasen över cirka 3 veckor för utvärdering av genomsnittlig procentuell eliminering. Testet anses vara slutfört när en tillräckligt hög grad av eliminering nås. Normalt ska testet inte pågå längre än 12 veckor från första tillsättning av testkemikalien.

Ömsning av film

42. Plötsligt avlägsnande av stora mängder överskottsfilm från rören ("ömsning"), sker med relativt regelbundna intervall. För att säkerställa att resultatens jämförbarhet inte påverkas bör testet täcka minst två fulla cykler av tillväxt och ömsning.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

43. Beräkna procentandelen DOC- eller COD-eliminering av testkemikalie för varje bedömningstidpunkt genom följande ekvation:

$$D_t = 100 [C_s - (E - E_0)] / C_s \%$$

där

D_t = procentuell eliminering av DOC (eller COD) vid tidpunkten t ,

C_s = koncentrationen DOC (eller COD) som kan tillskrivas testkemikalien, helst uppskattad utifrån stamlösningens koncentration och tillsatt volym (mg/l),

E = uppmätt DOC (eller COD) i testutflödet vid tidpunkten t (mg/l),

E_o = uppmätt DOC (eller COD) i kontrollutflödet vid tidpunkten t (mg/l).

Upprepa beräkningen för referenskemikalien, om sådan testas.

Kontrollreaktorns funktion

44. Graden av DOC- eller COD-eliminering (D_B) i det organiska mediet i kontrollenheten bidrar till bedömningen av den biologiska nedbrytningsaktiviteten i biofilmen under testet. Den procentuella elimineringen kan beräknas genom följande ekvation:

$$D_B = 100 (1 - E_o/C_m) \%$$

där

C_m = DOC (eller COD) i det organiska mediet i kontrollenhetens inflöde (mg/l).

45. Elimineringen av testkemikalie (D_{ST}) kan beräknas om den har uppmätts med en specifik analysmetod vid varje bedömningstidpunkt, genom följande ekvation:

$$D_{ST} = 100 (1 - S_e/S_i) \%$$

där

S_i = uppmätt eller helst uppskattad koncentration av testkemikalien i testinflödet (mg/l),

S_e = uppmätt koncentration av testkemikalien i testutflödet vid tidpunkten t (mg/l).

Om den analytiska metoden ger ett positivt värde i oförändrat avloppsvatten ekvivalent med S_c mg/l, kan den procentuella elimineringen (D_{SC}) beräknas genom följande:

$$D_{SC} = 100 (S_i - S_e + S_c)/(S_i + S_c) \%$$

Presentation av testresultat

46. Plotta den procentuella elimineringen D_t och D_{ST} (eller D_{SC}), om tillgänglig, mot tiden (se tillägg 2 till kapitel C.10 A). Beräkna medelvärdet (uttryckt i nästa heltal) och standardavvikelsen för de 12–15 värden för D_T (och D_{ST} om tillgängligt) som erhållits för platåfasen, som procentandelen eliminering av testkemikalien. Elimineringsskurvans form kan ge underlag för vissa slutsatser om elimineringsprocessen.

Adsorption

47. Om kraftig DOC-eliminering observeras från början av testet, är det sannolikt att testkemikalien elimineras genom adsorption på biofilmen. Detta kan eventuellt påvisas genom att bestämma mängden testkemikalie som adsorberas på fasta ämnen som lossnat från filmen. Det är inte vanligt att elimineringen av DOC för adsorberbara kemikalier förblir kraftig genom hela testet; eliminering är i regel kraftig i början för att sedan gradvis minska till ett jämviktsvärde. Om däremot den adsorberade testkemikalien på ett eller annat sätt kan orsaka akklimatisering av den mikrobiella populationen, stiger testkemikaliens DOC-eliminering därefter och når ett högt platåvärde.

Lagfas

48. På samma sätt som vid statistiska screeningtest, kräver många testkemikalier en lagfas innan full biologisk nedbrytning inträffar. Under lagfasen sker akklimatisering eller anpassning av de kompetenta bakterierna praktiskt taget utan eliminering av testkemikalien vid bakterietillväxtens inledande skede. Denna fas upphör och nedbrytningsfasen anses börja när cirka 10 % av den inledande mängden testkemikalie har eliminerats (efter att adsorption har fått ske, i förekommande fall). Lagfasen är ofta mycket varierande och svår att reproducera.

Platåfas

49. Platåfasen i en elimineringskurva för ett kontinuerligt test definieras som den fas då maximal nedbrytning sker. Platåfasen bör pågå minst 3 veckor och ska ge cirka 12–15 uppmätta giltiga värden.

Genomsnittlig elimineringsgrad för testkemikalien

50. Beräkna medelvärdet utifrån testkemikaliens elimineringsvärden D_t (och D_{50}) under platåfasen. Avrundat till närmaste heltal (i %) är detta testkemikaliens elimineringsgrad. Dessutom rekommenderas en beräkning av medelvärdets 95 % konfidensintervall. Beräkna på samma sätt genomsnittlig eliminering (D_B) av det organiska mediet i kontrollkärlet.

Indikation på biologisk nedbrytning

51. Om testkemikalien inte adsorberas i betydlig grad på biofilmen och elimineringskurvan har den typiska formen för en biologisk nedbrytningskurva med lagfas, kan nedbrytnings- och platåfaserna (punkterna 48, 49) med säkerhet tillskrivas biologisk nedbrytning. Om det har förekommit stark inledande eliminering kan simulations-testet inte användas för att skilja mellan biologiska och abiotiska elimineringsprocesser. I sådana fall, och i andra fall där det kan finnas tvivel om biologisk nedbrytning (t.ex. vid strippning), bör en analys göras rörande adsorberad testkemikalie eller ytterligare (screening)test för biologisk nedbrytning genomföras på grundval av parametrar som klart indikerar biologiska processer. Sådana test är syreupptagningsmetoder (kapitel C.4 i denna bilaga D, E och F (9)) eller test med mätning av koldioxidproduktion (kapitel C.4 C i denna bilaga) eller Headspace-metoden (10); som inokulat används förhandsexponerad biofilm från lämplig reaktor.
52. Om både DOC-eliminering och eliminering av specifik kemikalie har uppmätts och det finns betydande skillnader mellan elimineringsgraderna (DOC-elimineringen är lägre), tyder detta på att utflödena innehåller intermediära organiska produkter som kan vara svårare att bryta ned och som måste undersökas.

Testresultatens giltighet

53. Testet kan anses vara giltigt om graden av DOC- eller COD-eliminering (D_B) i kontrollenheten är > 80 % efter 2 veckor och inget ovanligt har observerats.
54. Om en lätt biologiskt nedbrytbar (referens)kemikalie har testats, bör graden av biologisk nedbrytbarhet vara > 90 % och skillnaden mellan duplikatvärden får inte vara större än 5 %. Om dessa två kriterier inte uppfylls bör försöksförfarandena ses över och/eller avloppsvatten från hushåll tas från en annan källa.
55. Likaså gäller att skillnader mellan bionedbrytningsvärden från duplikatenheter (om sådana används) för behandling av testkemikalie inte får avvika med mer än 5 %. Om detta kriterium inte uppfylls men elimineringen är stark, bör analysen fortsätta i ytterligare tre veckor. Om elimineringen är svag bör testkemikaliens inhiberande effekter undersökas, om de inte är kända, och testet upprepas med en lägre koncentration testkemikalie, om detta är genomförbart.

Testrapport

56. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

- Identifieringsdata.
- Fysikalisk natur och, när det är relevant, fysikalkemiska egenskaper.

Testbetingelser:

- Eventuella modifieringar av testsystemet, särskilt vid testning av olösliga eller flyktiga kemikalier.
- Typ av organiskt medium.
- Andel och egenskaper hos industriellt avfall i avloppsvattnet, om sådant ingår, och om kända.
- Inokuleringsmetod.
- Stamlösningens DOC (upplöst organiskt kol) och TOC (totalt organiskt kol), i förekommande fall berednings-sätt för suspension, använda testkoncentrationer, motivering för koncentrationer utanför intervallet 10–20 mg/l DOC, tillsättningsmetod, datum för första tillsättning, eventuella koncentrationsändringar.

- Genomsnittlig hydraulisk retentionstid (utan tillväxt), rörets rotationshastighet, ungefärlig lutningsvinkel, om möjligt.
- Uppgifter om lossning (ömsning), tid och intensitet.
- Testtemperatur och temperaturområde.
- Analystekniker som använts.

Testresultat:

- Alla uppmätta data (DOC, COD), specifika analyser, pH, temperatur, kvävekemikalier, om relevant.
- Alla beräknade värden för D_t (eller D_{t0}), D_B och D_{St} i tabellform samt elimineringskurvor.
- Information om lag- och platåfaserna, testets tidslängd, elimineringsgrad för testkemikalien och referenskemikalien (om testad) och för det organiska mediet (i kontrollenheten), tillsammans med statistiska data och utlåtanden om biologisk nedbrytbarhet och testets giltighet.
- Diskussion om resultaten.

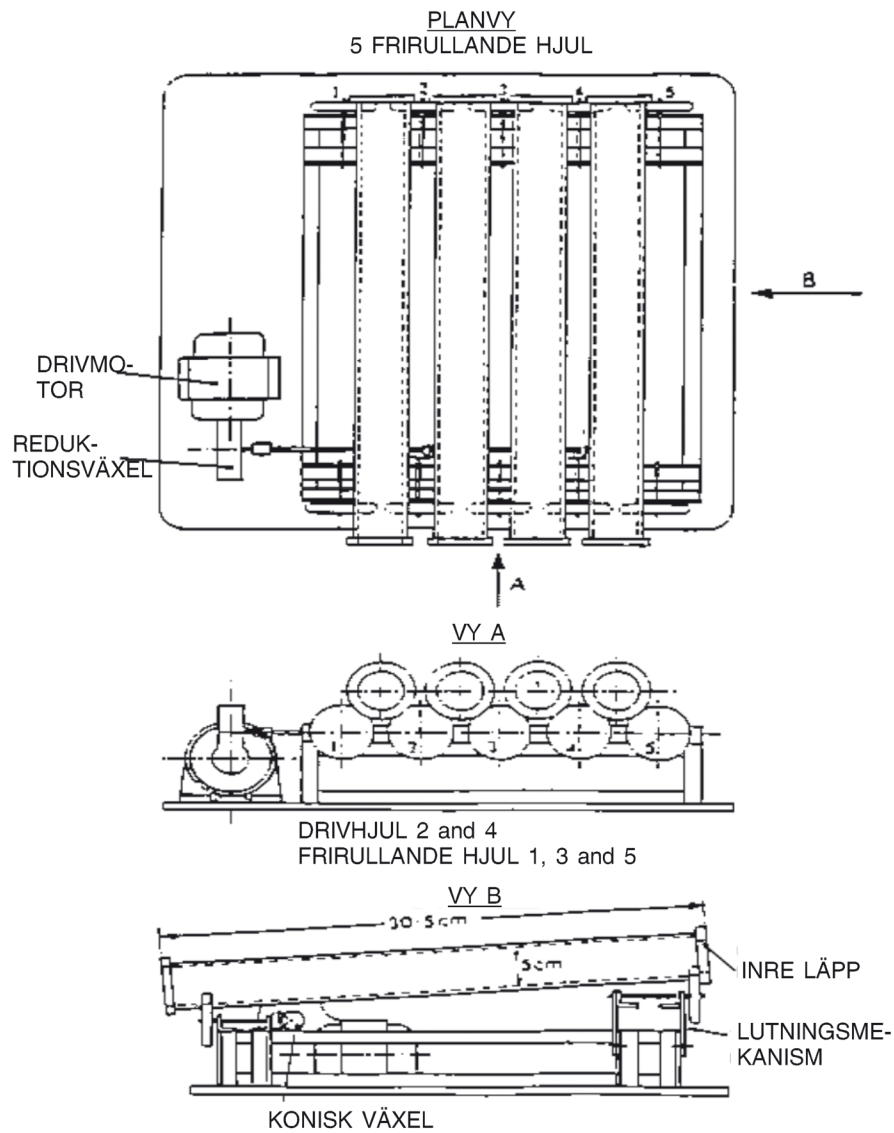
LITTERATUR

- (1) Gerike P., Fischer W., Holtmann W. (1980), "Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test", *Wat. Res.* 14, s. 753–758.
 - (2) Truesdale G. A., Jones K., Vandyke K. G. (1959), "Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material", *Wat. Waste Tr. J.* 7, s. 441–444.
 - (3) Baumann U., Kuhn G. och Benz M. (1998), "Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten", *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.* 10, s. 214–220.
 - (4) Gloyne E. F., Comstock R. F., Renn C. E. (1952), "Rotary tubes as experimental trickling filters", *Sewage ind. Waste* 24, s. 1355–1357.
 - (5) Kumke G. W., Renn C.E. (1966), "LAS removal across an institutional trickling filter", *JAOCS* 43, s. 92–94.
 - (6) Tomlinson T. G., Snaddon D. H. M., (1966), "Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms", *Int.J. Air Wat. Pollut.* 10, s. 865–881.
 - (7) Her Majesty's Stationery Office (1982), "Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability", 1981, London.
 - (8) Her Majesty's Stationery Office (1984), "Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes", 1982, London.
 - (9) Kapitel C.4 i denna bilaga, Bestämning av "lätt" bionedbrytbarhet A–F.
 - (10) ISO 14593 (1998), *Water Quality - Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.*
-

Tillägg 8

Figur 1

Roterande rör



Ordlista:

Planvy

Vy A/B

Drivhjul

Frirullande hjul

Drivmotor

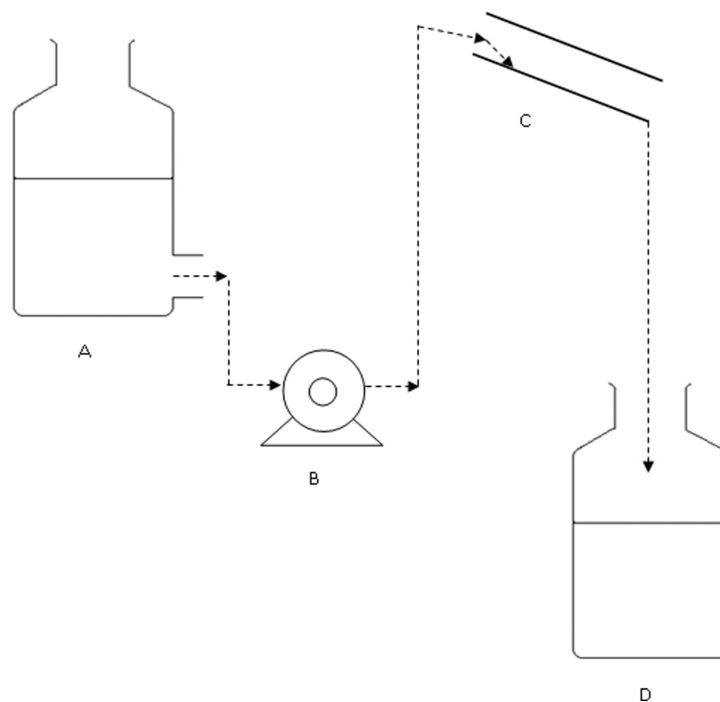
Reduktionsväxel

Inre läpp

Lutningsmekanism

Konisk växel

Figur 2
Flödesschema



A: Matningskär

B: Peristaltisk pump

C: Roterande rör

D: Uppsamlingskär för utflöde

DEFINITIONER

testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

kemikalier: termen kemikalie används i vid bemärkelse i Unced-avtal (Unced, United Nations Conference on the Environment and Development, dvs. Förenta nationernas konferens om miljö och utveckling) och i dokument som grundar sig på dessa, och termen omfattar ämnen, produkter, blandningar, beredningar eller motsvarande som kan användas i befintliga system.”

(10) Följande kapitel läggs till som kapitlen C.27, C.28, C.29 och C.30:

”C.27 TOXICITETSTEST I SEDIMENT- OCH VATTENFAS PÅ CHIRONOMIDLARVER MED SPIKAT SEDIMENT

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje 218 (2004). Syftet med testmetoden är att bedöma effekterna av långvarig kemikalieexponering på sedimentlevande larver i sötvatten av fjädermyggor *Chironomus* sp. Metoden är baserad på befintliga toxicitetstestprotokoll för *Chironomus riparius* och *Chironomus tentans* som har tagits fram i Europa (1) (2) (3) och Förenta staterna (4) (5) (6) (7) (8) samt ringtestats (1) (6) (9). Även övriga väldokumenterade chironomider kan användas, t.ex. *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).
2. Exponeringsscenarioet i denna testmetod går ut på att spika sediment med testämnet. Valet av lämpligt exponeringsscenario beror på den avsedda tillämpningen för testet. Scenarioet med spikning av sediment är avsett att simulera ackumulerade nivåer av kemikalier som finns kvar i sedimentet. Detta exponeringssystem innebär spikning av sediment i ett testsystem med sediment- och vattenfas.
3. Ämnen som behöver testas på sedimentlevande organismer är sådana som i allmänhet blir kvar i sedimentet under långa tidsperioder. De sedimentlevande organismerna kan exponeras via ett antal rutter. Den relativa betydelsen av varje exponeringsrutt och den tid det tar för var och en av dem att bidra till de totala toxiska effekterna beror på den berörda kemikalins fysikalkemiska egenskaper. För starkt adsorberande ämnen (t.ex. $\log K_{ow} > 5$) eller för ämnen som binds kovalent till sedimentet, kan förtäring av förorenad föda vara en betydande

exponeringsrutt. För att toxiciteten hos starkt lipofila ämnen inte ska underskattas kan tillsättning av föda till sedimentet före applicering av testämnet övervägas. För att alla potentiella exponeringsrutter ska beaktas har denna testmetod fokus på långvarig exponering. Testets längd är 20–28 dagar för *C. riparius* och *C. yoshimatsui* och 28–65 dagar för *C. tentans*. Om korttidsdata krävs för ett specifikt ändamål, t.ex. för att undersöka effekterna av en instabil kemikalie, kan tilläggsreplikat avlägsnas efter tio dagar.

4. De endpoints som mäts är det totala antalet kläckta vuxna exemplar och utvecklingstiden fram till kläckning. Det rekommenderas att mätningar av larvernas överlevnad och tillväxt endast görs efter en tiodagarsperiod i fall där ytterligare korttidsdata krävs, med användning av ytterligare replikat enligt vad som är lämpligt.
5. För detta test rekommenderas syntetiskt sediment. Syntetiskt sediment har flera fördelar jämfört med naturliga sediment:
 - Variationen mellan experiment reduceras eftersom syntetiskt sediment bildar en reproducerbar "standard-matris", och behovet av att få fram oförorenade och rena sediment elimineras.
 - Testningen kan inledas när som helst utan att beakta säsongvariationer i testsedimentet och det behövs ingen förbehandling av sediment för att få bort naturligt förekommande fauna. När syntetiskt sediment används uppstår heller inte kostnader för insamling på fältet av tillräckliga mängder sediment för rutin-testning.
 - Användning av syntetiskt sediment ger möjlighet till jämförelser av toxicitet och därmed klassificering av ämnen.
6. Definitioner finns i tillägg 1.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

7. Chironomidlarver i första larvstadiet exponeras för ett urval koncentrationer av testkemikalien i sediment-vattensystem. Testämnet spikas i sedimentet och därefter tillförs larverna i testkärnen som har stabiliserade sediment- och vattenkoncentrationer. Kläckning av fullbildade myggor och utvecklingshastighet mäts i slutet av testet. Överlevande larver och deras vikt kan också mätas efter tio dagar om så krävs (med användning av ytterligare replikat enligt det som är lämpligt). Dessa data analyseras med användning av en regressionsmodell för att uppskatta den koncentration som skulle orsaka \times % minskning av antalet fullbildade myggor eller av larvernas överlevnad eller tillväxt (t.ex. EC_{15} , EC_{50} osv.) eller genom användning av statistisk hypotesprövning för att bestämma NOEC/LOEC. Hypotesprövningen kräver en jämförelse mellan effektvärden och kontrollvärden med användning av statistiska test.

INFORMATION OM TESTÄMNET

8. Testämnets vattenlöslighet, ångtryck, uppmätta eller beräknade fördelning i sedimentet samt stabilitet i vatten och sediment bör vara kända. Det bör finnas en tillförlitlig analysmetod för kvantifiering av testämnet i överliggande vatten, porvatten och sediment med känd och rapporterad exakthet och detektionsgräns. Det är också bra att känna till testämnets strukturformel och renhet. Hur testämnet agerar kemiskt (t.ex. upplösning, abiotisk och biotisk nedbrytning osv.) hör också till den information som är användbar. Närmare vägledning för testning av ämnen vars fysikalkemiska egenskaper försvårar detta test finns i (12).

REFERENSKEMIKALIER

9. Referenskemikalier kan testas periodiskt för att säkerställa att testprotokollet och testbetingelserna är tillförlitliga. Exempel på toxiska referensämnen som med framgång har använts i ringtest och valideringsstudier är lindan, trifluranid, pentaklorfenol, kadmiumklorid och kaliumklorid (1) (2) (5) (6) (13).

TESTETS GILTIGHET

10. För att testet ska vara giltigt gäller följande villkor:
 - Kläckningen av vuxna exemplar i kontrollkärnen måste vara minst 70 % i slutet av testet (1) (6).
 - Kläckningen av vuxna exemplar av *C. riparius* och *C. yoshimatsui* i kontrollkärnen bör inträffa 12–24 dagar efter att de har införts i kärnen, för *C. tentans* krävs en period på 20–65 dagar.

- Vid slutet av testet bör pH och koncentrationen upplöst syre mätas i varje kärl. Syrekoncentrationen bör vara minst 60 % av luftmättnadsvärdet (ASV) vid den använda temperaturen och pH i överliggande vatten bör vara 6–9 i alla testkärl.
- Variationen i vattentemperatur får inte vara större än $\pm 1,0$ °C. Vattentemperaturen kan hållas under kontroll genom att göra testningen i ett isotermiskt utrymme, varvid rumstemperaturen bör kontrolleras med lämpliga tidsintervall.

METODBESKRIVNING

Testkärl

11. Testet görs i 600 ml-glasbägare med 8 cm i diameter. Även andra slags kärl kan användas, men då måste det gå att garantera att överliggande vatten och sediment har lämpliga djup. Sedimentytan bör vara tillräckligt stor för att ge 2–3 cm² per larv. Förhållandet mellan sedimentskiktets djup och överliggande vattnets djup bör vara 1:4. Testkärl och annan apparatur som kommer i kontakt med testsystemet bör vara gjorda av glas eller annat kemiskt inert material (t.ex. teflon).

Val av arter

12. Den art som används i testet ska helst vara *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* kan också vara lämplig, men den är svårare att hantera och kräver en längre testperiod. Även *Chironomus yohimatsui* kan användas. I tillägg 2 finns närmare uppgifter om odlingsmetoder för *Chironomus riparius*. Information om odlingsbetingelser finns också för andra arter, t.ex. *Chironomus tentans* (4) och *Chironomus yohimatsui* (11). Arternas identifiering måste bekräftas före testningen men är inte nödvändig före varje test om organismerna härrör från en odling inom laboratoriet.

Sediment

13. Helst ska syntetiskt sediment användas. Om naturligt sediment används bör dess egenskaper bestämmas (minst pH, halten organiskt kol, och gärna även andra parametrar såsom förhållandet C/N och granulometri). Sedimentet måste även vara fritt från föroreningar och andra organismer som kan konkurrera med eller konsumera chironomiderna. Dessutom rekommenderas att naturligt sediment som är avsett att användas i ett chironomid-toxicitetstest konditioneras i sju dagar under samma betingelser som råder i det efterföljande testet. Följande syntetiska sediment, baserat på den syntetiska jord som används i testmetod C.8 (14), rekommenderas för detta test (1) (15) (16):

- a) 4–5 % (torrvikt) torv så nära pH 5,5–6 som möjligt; det är viktigt att använda endast lufttorkad och finmalen torv i pulverform (partikelstorlek ≤ 1 mm).
- b) 20 % (torrvikt) kaolinlera (kaolinithalt helst över 30 %).
- c) 75–76 % (torrvikt) kvartssand (till största delen bestående av fin sand där mer än 50 % av partiklarna har storleken 50–200 μm).
- d) Avjoniserat vatten tillsatt så att blandningen får en slutlig fukthalt på 30–50 %.
- e) Kemiskt rent kalciumkarbonat (CaCO_3) tillsätts för att justera den slutliga sedimentblandningens pH till $7,0 \pm 0,5$. Den slutliga blandningens kolhalt bör vara 2 % $\pm 0,5$ % och kan justeras med hjälp av lämpliga mängder torv och sand, enligt punkterna a och c.

14. Torv, kaolinlera och sand ska härröra från kända källor. Sedimentkomponenterna bör kontrolleras för att bekräfta avsaknaden av kemiska föroreningar (t.ex. tungmetaller, organiska klorföreningar, organiska fosforföreningar osv.) Ett exempel på hur syntetiskt sediment kan tillredas beskrivs i tillägg 3. Det är också godtagbart att blanda torra beståndsdelar om det går att demonstrera att tillsats av överliggande vatten inte leder till att sedimentets beståndsdelar separerar (t.ex. flytande torvpartiklar) och att torven eller sedimentet konditioneras tillräckligt.

Vatten

15. Allt vatten som uppfyller de kemiska kriterierna för godtagbart utspädningsvatten (se tilläggen 2 och 4) är lämpligt som testvatten. Allt lämpligt vatten, naturligt vatten (ytvatten eller grundvatten), rekonstituerat vatten (se tillägg 2) och avklorerat kranvatten är godtagbart som odlings- och testvatten om chironomiderna överlever i det under odling, aklimatisering och testning utan att uppvisa tecken på stress. Vid teststart ska testvattnets pH vara mellan 6 och 9 och totalhårdheten får inte vara högre än 400 mg/l uttryckt som CaCO_3 . Om man

misstänker växelverkan mellan hårdhetsjoner och testämnet, bör vatten med lägre hårdhet användas (i en sådan situation får Elendt Medium M4 inte användas). Samma typ av vatten bör användas under hela testningen. De vattenkvalitetsegenskaper som förtecknas i tillägg 4 bör mätas minst två gånger om året eller om man misstänker att egenskaperna har ändrats betydligt.

Stamlösningar – spikat sediment

16. Spikat sediment med vald koncentration bereds i regel genom tillsättning av en lösning av testämnet direkt i sedimentet. En stamlösning av testämnet upplöst i avjoniserat vatten blandas med det syntetiska sedimentet i en rullkvarn, matningsblandare eller manuellt. Om testämnet har låg löslighet i vatten kan det lösas upp i minsta möjliga volym lämpligt organiskt lösningsmedel (t.ex. hexan, aceton eller kloroform). Denna lösning blandas sedan med 10 g fin kvartssand för ett testkärl. Lösningsmedlet får avdunsta och måste vara helt avlägsnat ur sanden, och därefter blandas sanden med lämplig mängd sediment per testbägare. Endast ämnen som avdunstar lätt får användas för att upplösa, dispergera eller emulgera testämnet. Här bör noteras att den sand som följer med testämnet och sandblandningen måste beaktas när sedimentet förbereds (dvs. sedimentet ska ha mindre mängd sand). Det är viktigt att se till att testämnet som tillsätts sedimentet fördelas omsorgsfullt och jämnt inom sedimentet. Vid behov kan delprover analyseras för att bestämma homogeniteten.

TESTETS UTFORMNING

17. Testets utformning avser antalet koncentrationer och intervallen mellan dem, antalet kärl per koncentration och antalet larver per kärl. Här beskrivs utformningar för uppskattning av effektkoncentration, uppskattning av NOEC och för gränstest.

Utformning för regressionsanalys

18. Effektkoncentrationen (t.ex. EC_{15} , EC_{50}) och det koncentrationsområde som är relevant för testämnet bör omfattas av de koncentrationer som ingår i testet. Allmänt taget gäller att exaktheten och särskilt giltigheten för uppskattningar av effektkoncentrationer (EC_x) förbättras när effektkoncentrationen ligger inom området för de koncentrationer som testas. Extrapolering under lägsta positiva koncentration eller över högsta koncentration bör undvikas. Preliminära test kan användas för att hitta rätt koncentrationsområde (se punkt 27).
19. Om EC_x ska uppskattas bör testet omfatta minst fem koncentrationer och tre replikat för varje koncentration. Det är under alla omständigheter tillrådligt att använda tillräckligt många testkoncentrationer för att få en god modelluppskattning. Faktorn mellan koncentrationer bör inte vara större än två (undantag kan göras i fall där dos-responskurvan har liten lutning). Antalet replikat per behandling kan minskas om antalet testkoncentrationer med olika respons ökas. En ökning av antalet replikat eller minskning av testkoncentrationsintervall tenderar att leda till ett smalare konfidensintervall för testet. Ytterligare replikat krävs om en uppskattning ska göras av larvernas överlevnad och tillväxt under en tiodagarsperiod.

Upplägg för uppskattning av NOEC/NOEC

20. Om LOEC eller NOEC ska uppskattas bör fem testkoncentrationer med minst fyra replikat användas och faktorn mellan koncentrationerna bör inte vara större än två. Antalet replikat bör vara tillräckligt för att säkerställa tillräcklig statistisk styrka för att upptäcka en skillnad på 20 % jämfört med kontrollen vid nivån 5 % för signifikans ($p = 0,05$). För uppskattning av utvecklingshastighet är det i regel lämpligt med variansanalys (ANOVA), såsom Dunnets eller Williams test (17) (18) (19) (20). För kläckningsfrekvens kan ett Cochran-Armitage-test, Fishers exakta test (med Bonferronikorrigerig) eller ett Mantel-Haenszel-test användas.

Gränstest

21. Gränstest kan göras (en testkoncentration och kontroll) om inga effekter framkommit vid det preliminära testet för att fastställa testområde. Syftet med gränstest är att genomföra ett test vid en koncentration som är tillräckligt hög för att man ska kunna utesluta eventuella toxiska effekter av testämnet, och gränsen sätts vid en koncentration som inte förväntas förekomma i någon situation. 1 000 mg/kg (torrvikt) rekommenderas. I regel krävs minst sex replikat både för behandling och kontroll. Man måste kunna demonstrera tillräcklig statistisk styrka för att upptäcka en skillnad på 20 % jämfört med kontrollen vid nivån 5 % för signifikans ($p = 0,05$). Eftersom t-test ger kvantitativ respons (utvecklingshastighet och vikt) är t-test en lämplig statistisk metod förutsatt att data uppfyller testkraven (normalitet, homogena varianser osv.). Om dessa krav inte uppfylls kan man använda t-testet med olika varians eller ett icke-parametriskt test, såsom Wilcoxon-Mann-Whitneys test. För kläckningsfrekvens är det lämpligt att använda Fischers exakta test.

FÖRFARANDE

Exponeringsbetingelser*Beredning av systemet med spikat sediment och vatten*

22. Det förfarande för spikning som beskrivs i testmetod C.8 (Toxicitet för daggmaskar) rekommenderas för applicering av testämnet (14). Spikade sediment placeras i kärnen och överliggande vatten tillsätts så att förhållandet mellan sediment och vatten är 1:4 (se punkterna 11 och 15). Sedimentets djup bör vara 1,5–3 cm. För att undvika separation av sedimentets beståndsdelar och återsuspension av finfördelat material medan testvatten tillsätts i vattenkolumnen, kan sedimentet täckas med en plastplatta medan vattnet tillsätts, varefter plattan avlägsnas omedelbart. Även andra metoder kan vara lämpliga.
23. Testkärnen bör vara täckta (t.ex. med glasplattor). Vid behov fylls under testets gång vatten på till ursprunglig volym för att kompensera för avdunstning. Detta bör göras med destillerat eller avjoniserat vatten för att förebygga ackumulering av salter.

Stabilisering

24. Efter beredning av spikat sediment och överliggande vatten rekommenderas att testämnet får fördelas från vattenfasen till sediment (3) (4) (6) (13). Detta bör helst göras med samma temperatur- och luftningsbetingelser som används vid testningen. Stabiliseringstiden beror på sedimentet och kemikalien, och kan variera mellan några timmar och flera dagar, i sällsynta fall upp till flera veckor (4–5 veckor). Eftersom en lång stabiliseringstid kan leda till att vissa kemikalier sönderfaller, eftersträvas här inte jämvikt; i stället rekommenderas en stabiliseringstid på 48 timmar. I slutet av denna jämviktsperiod ska testämnets koncentration mätas i det överliggande vattnet, porvattnet och sediment, åtminstone för den högsta koncentrationen och en lägre koncentration (se punkt 38). Dessa analytiska bestämningar av testämnet gör det möjligt att beräkna massbalans och uttrycka resultaten på grundval av uppmätta koncentrationer.

Tillförsel av testorganismer

25. Fyra till fem dagar innan testorganismerna tillförs testkärnen ska äggmassorna avlägsnas från odlingarna och placeras i små kärl i odlingsmedium. Åldrat medium från stamodling eller färskt berett medium kan användas. Om färskt medium används bör en liten mängd föda, t.ex. grönalger och/eller några droppar filtrat från en finmald suspension av fiskfoder i flingform tillsättas odlingsmediet (se tillägg 2). Endast färsk äggmassor får användas. I regel börjar larverna kläckas några dagar efter att äggen har lagts (2–3 dagar för *Chironomus riparius* vid 20 °C och 1–4 dagar för *Chironomus tentans* vid 23 °C och *Chironomus yoshimatsui* vid 25 °C), och larvernas tillväxt sker i fyra stadier på 4–8 dagar per stadium. För testet ska första stadiets larver användas (2–3 eller 1–4 dagar efter kläckningen). Bestämning av larvstadium kan möjligen göras genom mätning av huvudkapseldiameter (6).
26. Tjugo första stadiets larver fördelas slumpvis till varje testkärl som innehåller spikat sediment och vatten, med användning av en trubbig pipett. Luftningen av vattnet måste stoppas medan larverna tillsätts testkärnen och hållas stoppad i ytterligare 24 timmar efter tillsättningen (se punkterna 25 och 32). Enligt det testupplägg som används (se punkterna 19 och 20) är antalet larver per testkoncentration minst 60 för uppskattning av EC-punkt och 80 för bestämning av NOEC.

Testkoncentrationer

27. Ett preliminärt test kan användas för att fastställa koncentrationerna för det definitiva testet. För detta ändamål används en serie brett spridda koncentrationer av testämnet. För att få samma ytdensitet per chironomid som ska användas för det slutliga testet, exponeras chironomiderna för varje koncentration av testämnet under en period som ger möjlighet att uppskatta lämpliga testkoncentrationer. Inga replikat krävs.
28. Testkoncentrationerna för det definitiva testet baseras på resultaten från det preliminära testet. Det ska finnas minst fem testkoncentrationer som väljs enligt beskrivningen i punkterna 18–20.

Kontrollkärl

29. Kontrollkärl som inte innehåller testämne utan enbart sediment bör ingå i testet med lämpligt antal replikat (se punkterna 19 och 20). Om lösningsmedel har använts för applicering av testämnet (se punkt 16) bör det också finnas kontrollkärl med sediment och lösningsmedel.

Testsystem

30. De system som används är statiska. Semistatiska system eller genomflödessystem med intermittert eller kontinuerlig förnyelse av överliggande vatten kan användas i undantagsfall, t.ex. om vattenkvalitetspecifikationerna inte är lämpliga för testorganismen eller påverkar den kemiska jämvikten (t.ex. om syrenivåerna blir för låga, koncentrationen av utsöndrade produkter blir för hög eller om mineraler släpps ut från sedimentet och påverkar pH och/eller vattenhårdenheten). I regel är det dock tillräckligt och rekommendabelt att använda andra metoder för kompensering av kvaliteten på överliggande vatten, såsom luftning.

Foder

31. Larverna bör ges foder helst dagligen eller minst tre gånger per vecka. Fiskfoder (suspension i vatten eller finmalt foder, t.ex. Tetra-Min eller Tetra-Phyll, se närmare i tillägg 2) i mängder om 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg för *C. yoshimatsui*) per larv per dag anses vara lämpligt för unga larver under de tio första dagarna. För äldre larver kan det krävas lite större mängd: 0,5–1 mg per larv och dag bör vara tillräckligt för återstoden av testet. Mängden bör minskas för alla behandlingar och kontroller om det uppstår svamptillväxt eller mortalitet observeras i kontrollerna. Om svamptillväxten inte kan stoppas måste testet upprepas. Vid testning av starkt adsorberande ämnen (t.ex. $\log K_{ow} > 5$) eller ämnen som är kovalent bundna till sedimentet, kan mängden foder som krävs för att säkerställa överlevnad och naturlig tillväxt för organismerna tillsättas i det syntetiska sedimentet före stabiliseringsperioden. Då ska växtmaterial användas i stället för fiskfoder, t.ex. 0,5 % (torrvikt) finmalda löv från t.ex. brännässla (*Urtica dioica*), mullbär (*Morus alba*), vitklöver (*Trifolium repens*), spenat (*Spinacia oleracea*) eller annat växtmaterial (*Cerophyl* eller alfacellulosa).

Inkubationsbetingelser

32. Skonsam luftning av överliggande vatten i testkärnen införs helst 24 timmar efter tillsättning av larverna och får pågå genom hela testet (se till att halten upplöst syre inte faller under 60 % av luftmättnadsvärdet ASV). Luftningen görs med hjälp av en Pasteur-glaspipett som är fäst 2–3 cm ovanför sedimentskiktet (en eller ett fåtal bubblor per sekund). Vid testning av flyktiga kemikalier kan man överväga att utesluta luftning av sediment-vattensystemet.
33. Testet genomförs vid konstant temperatur på 20 °C (± 2 °C). För *C. tentans* och *C. yoshimatsui* rekommenderas temperaturer på 23 °C respektive 25 °C (± 2 °C). En ljusperiod på 16 timmar används och ljusintensiteten ska vara 500–1 000 lux.

Exponeringstid

34. Exponeringen inleds när larver tillsätts i spikade kärl och kontrollkärl. Den maximala exponeringstiden är 28 dagar för *C. riparius* och *C. yoshimatsui* och 65 dagar för *C. tentans*. Om myggor kläcks tidigare, kan testet avslutas efter minst fem dagar efter att det sista vuxna exemplaret har kläckts i kontrollen.

Observationer

Kläckning

35. Utvecklingstiden och totalantalet fullbildade han- och honmyggor bestäms. Hanarna är lätta att känna igen på sina fjäderantenner.
36. Testkärnen bör granskas visuellt minst tre gånger i veckan för att bedöma förekomsten av onormalt beteende (t.ex. exemplar som lämnar sedimentet, ovanligt simmande) jämfört med kontrollen. Under perioden för förväntad kläckning är det nödvändigt att dagligen räkna antalet kläckta exemplar. Kön och antal fullbildade exemplar registreras dagligen. Efter identifiering avlägsnas myggorna från kärnen. Ägg som har deponerats före testets slutförande bör registreras och därefter avlägsnas för att förhindra att larver på nytt introduceras i sedimentet. Likaså ska registrering göras av antalet synliga puppor som inte har kläckts. Vägledning om övervakning av kläckning finns i tillägg 5.

Tillväxt och överlevnad

37. Om det krävs data om överlevnad och tillväxt under en tiodagarsperiod bör ytterligare testkärl införlivas från början, så att dessa därefter kan användas. Larverna i sedimentet från dessa tilläggskärl tillvaratas genom sällning med ett 250 μm -säll. Kriterierna för död är orörlighet eller utebliven reaktion på mekanisk stimulans. Larver som inte tillvaratas bör räknas som döda (larver som har dött i början av testet kan ha sönderdelats av mikrober). Torrvikten (askfri) för överlevande larver per testkärl bestäms och den genomsnittliga individuella torrvikten per kärl beräknas. Det är bra att bestämma vilket stadium överlevande larver tillhör, och för detta kan mätning av huvudkapselns bredd användas.

Analytiska mätningar

Testämnets koncentration

38. Innan testet inleds, dvs. före tillsättning av larver, tas prover av bulksediment från minst ett kärl per behandling för analytisk bestämning av testämnets koncentration i sedimentet. Man bör åtminstone analysera prover av överliggande vatten, porvatten och sediment i början (se punkt 24) och i slutet av testet, för den högsta koncentrationen och en lägre koncentration. Dessa bestämningar av testämneskoncentrationen ger information om testämnets beteende/fördelning i vatten-sedimentsystemet.
39. Om mellanliggande mätningar görs (t.ex. dag 7) och om det för analysen krävs stora prover som inte kan tas från testkärlen utan att testsystemet påverkas, bör de analytiska bestämningarna göras på prover som tas från extra testkärl som behandlas på samma sätt (inklusive förekomst av testorganismer) men som inte används för biologiska observationer.
40. Centrifugering vid t.ex. 10 000 g och 4 °C i 30 minuter är det rekommenderade förfarandet för att isolera porvatten. Om det har demonstrerats att testämnet inte adsorberas på filter kan även filtrering godtas. I vissa fall är det kanske inte möjligt att analysera koncentrationerna i porvattnet därför att provet är för litet.

Fysikalkemiska parametrar

41. Testkärlens pH och temperatur bör mätas på lämpligt sätt (se punkt 10). Hårdhet och ammonium bör mätas i kontrollerna och ett testkärl vid den högsta koncentrationen i början och slutet av testet.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

42. Syftet med detta test är att bestämma testämnets effekt på utvecklingshastigheten och totalantalet fullbildade han- och honmyggor eller, om det gäller ett tiodagartest, effekterna på larvernas överlevnad och vikt. Om det inte finns indikationer på statistiskt avvikande känslighet för hanar och honor, kan resultaten poolas för statistiska analyser. Känslighetsskillnaderna mellan hanar och honor kan bedömas statistiskt, t.ex. genom ett " χ^2 -r × 2 table test". Larvernas överlevnad och genomsnittlig individuell torrsvikt per kärl måste bestämmas efter tio dagar där detta krävs.
43. Effektkoncentrationerna uttryckta och baserade på torrsvikt beräknas helst på grundval av uppmätta sediment-koncentrationer vid testets början (se punkt 38).
44. För att beräkna en punktvis uppskattning av EC_{50} eller något annat EC_x -värde, kan statistiken per kärl användas som äkta replikat. Vid beräkning av konfidensintervallet för ett EC_x -värde bör variansen mellan kärl beaktas, eller så bör man påvisa att variansen är så liten att den kan ignoreras. Om modellen anpassas med minsta kvadratmetoden bör transformation tillämpas på den kärldata statistiken i syfte att förbättra variansens homogenitet. EC_x -värdena bör dock beräknas när responsen har transformerats tillbaka till det ursprungliga värdet.
45. När syftet med den statistiska analysen är att bestämma NOEC/LOEC genom hypotestestning, måste variansen mellan kärl beaktas, t.ex. genom nästad ANOVA. Alternativt kan mer robust testning (21) vara lämplig i situationer där de vanliga ANOVA-antagandena inte gäller.

Kläckningsfrekvens

46. Kläckningsfrekvenser är dikotoma (tvåpunktsfördelade) data och kan analyseras genom Cochran-Armitage test som tillämpas på step-down-grund där monoton dos-respons förväntas och dessa data stämmer överens med förväntningen. Om inte, kan Fishers exakta test eller ett Mantel-Haenszel-test med Bonferroni-Holm-korrigerade p-värden användas. Om det finns bevis på större variation mellan replikat inom samma koncentration än det som en binomial fördelning skulle indikera (ofta kallad extra-binomial fördelning), bör ett robust Cochran-Armitage-test eller Fischers exakta test användas, enligt det som föreslås i punkt 21.

Det totala antalet myggor som kläckts per kärl, n_e , bestäms och divideras med antalet tillsatta larver, n_a enligt följande:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

där:

ER = kläckningsfrekvens

n_e = antalet myggor som kläckts per kärl

n_a = antalet larver som tillsatts per kärl

47. Ett alternativ som bäst lämpar sig för stora provstorlekar, när det finns extra-binomial varians, är att behandla kläckningsfrekvensen som en kontinuerlig respons och använda förfaranden såsom William-test när monoton dos-respons förväntas och stämmer överens med dessa data för kläckningsfrekvens. Dunnett-test är lämpligt i fall där det inte är hållbart med monotonicitet. I detta sammanhang definieras begreppet "stort prov" som ett prov där antalet kläckta och antalet inte kläckta överstiger fem, per replikatkärl.
48. Vid användning av ANOVA-metoder bör värdena för kläckningsfrekvens först transformeras genom arcsin-sqrt-transformation eller Freeman-Tukeytransformation för att få en ungefärlig normalfördelning och jämna ut varianserna. Cochran-Armitage-test, Fishers exakta test (Bonferroni) eller Mantel-Haenszel-test kan användas när absoluta frekvenser används. För att göra arcsin-sqrt-transformation tar man inverterad sinus (\sin^{-1}) av kvadratroten av kläckningsfrekvensen.
49. EC_x -värden för kläckningsfrekvenser beräknas med regressionsanalys (t.ex. probit (22), logit, Weibull, lämplig kommersiell mjukvara eller dyligt). Om regressionsanalysen inte lyckas (om det t.ex. finns mindre än två partiella responser) används andra icke-parametriska metoder såsom glidande medelvärde eller enkel interpolering.

Utvecklingshastighet

50. Med genomsnittlig utvecklingstid avses den genomsnittliga tidsomfattningen mellan tillsättning av larver (testdag 0) och kläckningen av den experimentella kohorten myggor (för beräkning av den faktiska utvecklingstiden bör man beakta larvernas ålder vid tillsättningstidpunkten). Värdet för utvecklingshastighet är det reciproka värdet av tidsenheten för utveckling (enhet: 1/dag) och representerar den andel larvutveckling som sker per dag. Utvecklingshastigheten är det mått som helst ska användas för utvärdering av dessa sedimenttoxicitetsstudier eftersom variansen är lägre och homogener samt närmare normalfördelningen i jämförelse med utvecklingstiden. Kraftfulla parametriska testförfaranden kan alltså användas baserade på utvecklingshastighet hellre än på utvecklingstid. För utvecklingshastighet som en kontinuerlig respons kan EC_x -värden uppskattas med hjälp av regressionsanalys (t.ex. (23), (24)).
51. För efterföljande statistiska test antas antalet myggor observerade på inspektionsdag x ha kläckts i mitten av tidsintervallet mellan dag x och dag $x-1$ (l är inspektionsintervallets längd, i regel 1 dag). Genomsnittlig utvecklingshastighet per kärl (\bar{x}) beräknas enligt följande:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

där:

\bar{x} : genomsnittlig utvecklingshastighet per kärl

i : index för inspektionsintervall

m : maximiantalet inspektionsintervall

f_i : antalet myggor som kläckts under inspektionsintervallet i

n_e : totalantalet myggor som kläckts i slutet av experimentet ($= \sum f_i$)

x_i : utvecklingshastigheten för myggor som kläckts under intervallet i

$$x_i = \frac{1}{\left(\text{day}_i - \frac{1}{2}\right)}$$

där:

dag_i : inspektionsdag (dagar från appliceringen)

l_i : inspektionsintervallets längd i (dagar, i regel 1 dag)

Testrapport

52. Testrapporten ska innehålla minst följande uppgifter:

Testämne:

- Fysikalisk natur och, där det är relevant, fysikalkemiska egenskaper (vattenlöslighet, ångtryck, fördelningskoefficient i jord (eller i sediment, om tillgänglig), stabilitet i vatten osv.).
- Kemiska identifieringsdata (trivialnamn, kemiskt namn, strukturformel, CAS-nummer osv.) samt renhet och analysmetod för kvantifiering av testämnet.

Testarter:

- Organismer som använts för testet: art, vetenskapligt namn, ursprung och odlingsbetingelser.
- Information om hantering av äggmassor och larver.
- Organismernas ålder när de tillförs testkärnen.

Testbetingelser:

- Sediment som använts (naturligt eller syntetiskt).
- För naturligt sediment, insamlingsplatsens belägenhet och beskrivning av sedimentet, inbegripet i mån av möjlighet föroreningshistoria och egenskaper: pH, halten organiskt kol, C/N-kvot och granulometri (om lämpligt).
- Beredning av syntetiskt sediment: beståndsdelar och egenskaper (halten organiskt kol, pH, fukthalt osv. vid testets början).
- Beredning av testvatten (om rekonstituerat vatten används) och egenskaper (syrehalt, pH, konduktivitet, hårdhet osv. vid testets början).
- Sedimentets och överliggande vattnets djup.
- Volymen för överliggande vatten och porvatten, vikten för vått sediment med och utan porvatten.
- Testkärl (material och storlek).
- Metod för spikning av sediment: testkoncentrationer, antalet replikat och, i förekommande fall, använt lösningsmedel.
- Fasen för stabilisering av jämvikt i systemet med spikat sediment och vatten: varaktighet och betingelser.
- Inkubationsbetingelser: temperatur, ljuscykel och intensitet samt luftning (frekvens och intensitet).
- Detaljerad information om utfodringen, inklusive typ av foder, beredning, mängd och utfodringsschema.

Resultat:

- Nominella testkoncentrationer, uppmätta testkoncentrationer och resultaten av alla analyser för bestämning av testämnets koncentration i testkärl.
- Vattenkvaliteten i testkärnen – pH, temperatur, upplöst syre, hårdhet och ammonium.
- Ersättning av avdunstat testvatten, i förekommande fall.
- Antalet kläckta hon- och hanmyggor per kärl och dag.
- Antalet larver som inte utvecklats till myggor, per kärl.
- Genomsnittlig individuell torrsvikt för larver per kärl och per stadium, om lämpligt.
- Procentandel kläckta exemplar per replikat- och testkoncentration (han- och honmyggor poolade).

- Genomsnittlig utvecklingshastighet för fullbildade myggor per replikat och behandlingsnivå (han- och honmyggor poolade).
- Uppskattning av toxiska endpoints t.ex. EC_x (och associerade konfidensintervall), NOEC och/eller LOEC och de statistiska metoder som använts för bestämning av dem.
- Diskussion av resultaten, inbegripet inverkan på testresultatet som kan tillskrivas avvikelser från denna testmetod.

LITTERATUR

- (1) BBA (1995), "Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system", redigerat av M. Streloke och H.Köpp. Berlin 1995.
- (2) Fleming R. m.fl. 1994), "Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances", Slutlig rapport till Europeiska kommissionen, rapport nr EC 3738, augusti 1994, WRc, UK.
- (3) SETAC (1993), "Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments", WOSTA Workshop, Nederländerna.
- (4) ASTM International/E1706-00 (2002), "Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates", s. 1125–1241, *ASTM International 2002 Annual Book of Standards*, vol. 11.05, "Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides", ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (5) Environment Canada (1997), "Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method", Report SPE 1/RM/32, december 1997.
- (6) US-EPA (2000), "Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates", andra utgåvan, EPA 600/R-99/064, mars 2000, revidering av första utgåvan juni 1994.
- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), "Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates".
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), "Chironomid Sediment toxicity Test".
- (9) Milani D., Day K. E., McLeay D. J. och Kirby R. S. (1996), "Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*)" Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Kanada.
- (10) Sugaya Y. (1997), "Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*", *Jp. J. Sanit. Zool.* 48 (4), s. 345–350.
- (11) Kawai K. (1986), "Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera)", *Jp. J. Sanit. Zool.* 37 (1), s. 47–57.
- (12) OECD, 2000, "Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures", *OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment*, Nr 23.
- (13) Environment Canada (1995), "Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant", Report EPS 1/RM/30, september 1995.
- (14) Testmetod C.8 i denna bilaga, Toxicitet hos daggmaskar.
- (15) Suedel B. C. och Rodgers J. H. (1994), "Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing", *Environ. Toxicol. Chem.* 13, s. 1163–1175.
- (16) Naylor C. och Rodrigues C., (1995), "Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment", *Chemosphere* 31, s. 3291–3303.

-
- (17) Dunnett C. W. (1964), "A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control", *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, s. 1096–1121.
- (18) Dunnett C. W. (1964), "New tables for multiple comparisons with a control", *Biometrics*, 20, s. 482–491.
- (19) Williams D. A. (1971), "A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control", *Biometrics*, 27, s. 103–117.
- (20) Williams D. A. (1972), "The comparison of several dose levels with a zero dose control", *Biometrics*, 28, s. 510–531.
- (21) Rao J. N. K. och Scott A. J. (1992), "A simple method for the analysis of clustered binary data", *Biometrics*, 48, s. 577–585.
- (22) Christensen E. R. (1984), "Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model", *Water Research* 18, s. 213–221.
- (23) Bruce och Versteeg (1992), "A statistical procedure for modelling continuous toxicity data", *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, s. 1485–1494.
- (24) Slob W. (2002), "Dose-response modelling of continuous endpoints", *Toxicol. Sci.* 66, s. 298–312.
-

Tillägg 1

DEFINITIONER

I denna testmetod gäller följande definitioner:

syntetiskt sediment: rekonstituerat, konstgjort sediment som är en blandning av material avsedda att efterlikna de fysiska beståndsdelarna i naturligt sediment.

överliggande vatten: det vatten som hålls ovanför sedimentet i testkärlet.

porvatten: det vatten som finns i mellanrummen mellan sediment- och jordpartiklar.

spikat sediment: sediment med tillsatt testämne.

testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

Tillägg 2

Rekommendationer för odling av *Chironomus riparius*

1. *Chironomus*-larver kan odlas i kristalliseringskärn eller stora behållare. Fin kvartssand sprids som ett tunt skikt på cirka 5–10 mm på behållarens botten. Även kiselgur (t.ex. Merck, Art. 8117) har visat sig vara ett lämpligt substrat (det räcker med ett tunt lager på några mm). Lämpligt vatten tillsätts till ett djup på flera cm. Vattennivåerna bör fyllas på efter behov för att ersätta avdunstning och förebygga uttorkning. Vattnet kan vid behov ersättas. Det bör finnas en skonsam luftning. De kärn som innehåller larver bör hållas i en lämplig bur som hindrar vuxna exemplar från att rymma. Buren bör vara tillräckligt stor för att de vuxna exemplaren ska kunna svärma, annars kan kopulation utebli (minimum är cirka 30 × 30 × 30 cm).
2. Burarna ska hållas i rumstemperatur eller ett tempererat utrymme vid 20 ± 2 °C med en ljusperiod på 16 timmar (intensitet ca 1 000 lux) och 8 timmar mörker. Det har rapporterats att luftfuktighet under 60 % RH kan hämma reproduktion.

Utspädningsvatten

3. Allt lämpligt naturligt eller syntetiskt vatten kan användas. Ofta används källvatten, avklorerat kranvatten och artificiella medier (t.ex. Elendt M4 eller M7, se nedan). Vattnet måste luftas före användningen. Vid behov kan odlingsvattnet förnyas genom att försiktigt hälla eller sifonera använt vatten från odlingskärnen utan att förstöra larvrören.

Utfodring av larver

4. *Chironomus*-larverna ges fiskfoder i flingform (Tetra Min®, Tetra Phyll® eller motsvarande patenterat märke), cirka 250 mg per kärn och dag. Fodret kan ges i form av torrt malet pulver eller som suspension i vatten: 1,0 g flingfoder blandas med 20 ml utspädningsvatten till en homogen blandning. Beredningen kan ges med en dosering på cirka 5 ml per kärn och dag (skaka om före användning). Äldre larver kan få en större dos.
5. Utfodringen justeras enligt vattenkvaliteten. Om odlingsmediet blir grumligt bör dosen sänkas. Foderdoseringen måste övervakas noggrant. För liten mängd leder till att larverna emigrerar mot vattenkolumnen och för stor mängd leder till ökad mikrobiell aktivitet och lägre syrekoncentrationer. Båda omständigheterna kan leda till minskad tillväxt.
6. Även celler av vissa grönalger (t.ex. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) kan tillsättas när nya odlingskärn läggs upp.

Utfodring av vuxna exemplar

7. Vissa testutövare har föreslagit att bomullskompresser indränkta i mättad sukroslösning kan användas som foder för vuxna exemplar.

Kläckning

8. Vid 20 ± 2 °C börjar vuxna exemplar kläckas i odlingskärnen efter cirka 13–15 dagar. Hanarna är lätta att känna igen på sina fjäderantenner.

Äggmassor

9. När vuxna exemplar finns i odlingsburen bör alla larver i odlingskärnen kontrolleras tre gånger per vecka för att se om gelatinösa äggmassor har deponerats. Om sådana upptäcks, bör de avlägsnas försiktigt. Äggmassorna överförs till ett litet kärn som innehåller ett prov av odlingsvattnet. De används sedan för att starta nya odlingskärn (t.ex. 2–4 äggmassor per kärn) eller för toxicitetstest.

10. Första stadiets larver bör kläckas efter 2–3 dagar.

Uppläggning av nya odlingskärn

11. När odlingarna är etablerade bör det vara möjligt att lägga upp en färsk larvodling veckovis eller med längre intervall beroende på testningskraven, och avlägsna äldre kärn efter att vuxna myggor har kläckts. På detta sätt fås regelbunden tillgång till vuxna exemplar med minimal insats.

Beredning av testlösningarna M4 och M7

12. M4-mediet upptäcktes av Elendt (1990). M7-mediet bereds på samma sätt som M4-mediet med undantag för de ämnen som anges i tabell 1, för vilka koncentrationerna är fyra gånger lägre i M7 jämfört med M4. En publikation om M7-mediet är under arbete (Elendt, personlig kommunikation). Testlösningen ska inte beredas enligt Elendt och Bias (1990) eftersom de angivna koncentrationerna av $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 och K_2HPO_4 inte är lämpliga.

Beredning av M7-medium

13. Varje stamlösning (I) bereds individuellt och en kombinerad stamlösning (II) bereds av dessa stamlösningar (I) (se tabell 1). 50 ml av den kombinerade stamlösningen (II) och de mängder av varje stamlösning med makronäring som anges i tabell 2 och avjoniserat vatten tillsätts upp till 1 liter för att bereda M7-mediet. En stamlösning med vitaminer bereds genom att tillsätta tre vitaminer till avjoniserat vatten enligt tabell 3, och 0,1 ml av den kombinerade vitaminstamlösningen tillsätts till det slutliga M7-mediet strax före användningen (vitaminstamlösningen förvaras djupfryst i små alikvoter). Mediet luftas och stabiliseras.

LITTERATUR

BBA (1995), "Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system", redigerat av M. Streloke och H. Köpp. Berlin 1995.

Tabell 1

Stamlösningar av spårelement för M4- och M7-medium

Stamlösningar (I)	Mängd (mg) som byggs upp till 1 liter med avjoniserat vatten	Beredning av kombinerad stamlösning (II): blanda följande mängder (ml) stamlösning (I) och bygg upp till 1 liter med avjoniserat vatten		Slutliga koncentrationer i testlösningarna (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl_2	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Dessa ämnen avviker i M4 och M7, såsom anges ovan.

(2) Dessa ämnen bereds individuellt, blandas och autoklaveras omedelbart.

Tabell 2

Stamlösningar med makronäringsämnen för medium M4 och M7

	Mängd som byggs upp till 1 liter med avjoniserat vatten (mg)	Mängd stamlösning med makronäringsämnen som tillsätts för att bereda medium M4 och M7 (ml/l)	Slutliga koncentrationer i testlösningarna M4 och M7 (mg/l)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	293 800	1,0	293,8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ · 9H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2 740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	0,1	0,184

Tabell 3

Stamlösningar med vitaminer för medium M4 och M7 Alla tre vitaminlösningar kombineras till en enda vitaminstamlösning.

	Mängd som byggs upp till 1 liter med avjoniserat vatten (mg)	Mängd stamlösning med vitaminer som tillsätts för att bereda medium M4 och M7 (ml/l)	Slutliga koncentrationer i testlösningarna M4 och M7 (mg/l)
Tiaminhydroklorid	750	0,1	0,075
Cyanokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

LITTERATUR

Elenndt, B. P. (1990), "Selenium Deficiency in Crustacean", *Protoplasma* 154, s. 25–33.

Elenndt, B. P. och W. R. Bias (1990), "Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*", *Water Research* 24 (9), s. 1157–1167.

Tillägg 3

BEREDNING AV SYNTETISKT SEDIMENT

Sedimentsammansättning

Syntetiskt sediment ska ha följande sammansättning:

Beståndsdel	Egenskaper	% av sedimentets torrsvikt
Torv	Sphagnum, så nära pH 5,5–6 som möjligt utan synliga växtrester och finfördelad (partikelstorlek ≤ 1 mm) och lufttorkad.	4–5
Kvartssand	Partikelstorlek: > 50 % av partiklarna bör ha storlek inom området 50–200 μm	75–76
Kaolinitlera	Kaolinithalt ≥ 30 %	20
Organiskt kol	Justeras genom tillsats av torv och sand	2 ($\pm 0,5$)
Kalciumkarbonat	CaCO_3 , pulveriserat, kemiskt rent	0,05–0,1
Vatten	Konduktivitet ≤ 10 $\mu\text{S/m}$	30–50

Beredning

Torven lufttorkas och mals ner till ett fint pulver. En suspension av behövlig mängd torvpulver i avjoniserat vatten bereds med effektiv homogeniseringsapparat. Suspensionens pH justeras till $5,5 \pm 0,5$ med CaCO_3 . Suspensionen konditioneras minst två dagar med skonsam omrörning vid 20 ± 2 °C, för att stabilisera pH och etablera en stabil mikrobiell komponent, varefter pH uppmäts på nytt och bör vara $6,0 \pm 0,5$. Torvsuspensionen blandas sedan med de övriga beståndsdelarna (sand och kaolinitlera) och avjoniserat vatten till ett homogent sediment med en vattenhalt som ger kring 30–50 procent torrsvikt av sediment. Därefter mäts den slutliga blandningens pH på nytt och justeras vid behov till 6,5–7,5 med CaCO_3 . Prover tas av sedimentet för att bestämma torrsvikten och halten organiskt kol. Likaså rekommenderas att det syntetiska sediment som ska användas i ett chironomidtoxicitetstest konditioneras före användningen i sju dagar i samma betingelser som råder i det efterföljande testet.

Förvaring

De torra beståndsdelarna för beredning av syntetiskt sediment kan lagras i ett torrt och svalt utrymme vid rumstemperatur. Berett (vått) sediment ska inte lagras för användning i test. Det bör användas omedelbart efter den 7 dagar långa konditioneringsperioden i slutet av beredningen.

LITTERATUR

Kapitel C.8 i denna bilaga, Toxicitet hos daggmaskar.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998), "Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media", *Ecotox. and Environ. Safety* 39, s. 10–20.

Tillägg 4

Krav på kemiska egenskaper hos utspädningsvatten

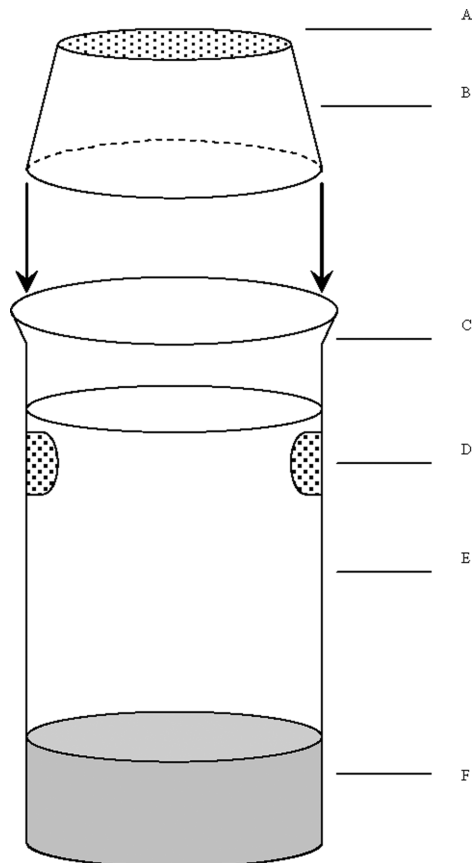
Ämne	Koncentrationer
Partikelinnehåll	< 20 mg/l
Totalt organiskt kol	< 2 mg/l
Ojoniserad ammoniak	< 1 µg/l
Hårdhet som CaCO ₃	< 400 mg/l (*)
Restklor	< 10 µg/l
Bekämpningsmedel med organiska fosforföreningar, totalt.	< 50 ng/l
Bekämpningsmedel med organiska klorföreningar plus polyklorerade bifenyl, totalt.	< 50 ng/l
Totalt organiskt klor	< 25 ng/l

(*) Här bör noteras att om man misstänker växelverkan mellan hårdhetsjoner och testämnet, bör vatten med lägre hårdhet användas (och i en sådan situation får Elendt Medium M4 inte användas).

Tillägg 5

Vägledning för övervakning av kläckning av chironomider

Fällor placeras på testbågarna. Dessa fällor behövs från dag 20 fram till testets slut. Exempel på en fälla visas nedan.



- | | |
|------------------------------|----------------------------------|
| A: nylonnät | D: filterportar för vattenutbyte |
| B: upp-och-nedvänd plastkopp | E: vatten |
| C: exponeringskärl utan läpp | F: sediment |

C. 28 TOXICITETSTEST I SEDIMENT- OCH VATTENFAS PÅ CHIRONOMID-LARVER MED SPIKAT VATTEN

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje 219 (2004). Syftet med testmetoden är att bedöma effekterna av långvarig kemikalieexponering på sedimentlevande larver i sötvatten av fjädermyggor *Chironomus* sp. Den baserar sig i huvudsak på BBA-vägledningen med ett sediment-vatten-testsystem med syntetisk jord och vattenkolumnexponering (1). Metoden beaktar också existerande toxicitetstestprotokoll för *Chironomus riparius* och *Chironomus tentans* som har tagits fram i Europa och Förenta staterna (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) och ringtestats (1) (6) (9). Även övriga väldokumenterade chironomider kan användas, t.ex. *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).
2. Exponeringen i denna testmetod görs med spikat vatten. Valet av lämpligt exponeringsscenario beror på den avsedda tillämpningen för testet. Vattenexponeringen med spikad vattenkolumn är avsedd att simulera vindavdrift av bekämpningsmedel och täcker den inledande toppkoncentrationen i porvatten. Metoden är också användbar för andra typer av exponering (inklusive kemikaliespill), med undantag för ackumuleringsprocesser som är längre än testperioden.

3. Ämnen som behöver testas på sedimentlevande organismer är sådana som i allmänhet blir kvar i sedimentet under långa tidsperioder. De sedimentlevande organismerna kan exponeras via ett antal rutter. Den relativa betydelsen av varje exponeringsrutt och den tid det tar för var och en av dem att bidra till de totala toxiska effekterna beror på den berörda kemikalins fysikalkemiska egenskaper. För starkt adsorberande ämnen (t.ex. $\log K_{ow} > 5$) eller för ämnen som binds kovalent till sedimentet, kan förtäring av förorenad föda vara en betydande exponeringsrutt. För att toxiciteten hos starkt lipofila ämnen inte ska underskattas kan tillsättning av föda till sedimentet före applicering av testämnet övervägas. För att alla potentiella exponeringsrutter ska beaktas har denna testmetod fokus på långvarig exponering. Testets längd är 20–28 dagar för *C. riparius* och *C. yoshimatsui* och 28–65 dagar för *C. tentans*. Om korttidsdata krävs för ett specifikt ändamål, t.ex. för att undersöka effekterna av instabila kemikalier, kan tilläggsreplikat avlägsnas efter tio dagar.
4. De endpoints som mäts är det totala antalet kläckta vuxna exemplar och utvecklingstiden fram till kläckning. Det rekommenderas att mätningar av larvernas överlevnad och tillväxt endast görs efter en tiodagarsperiod i fall där ytterligare korttidsdata krävs, med användning av ytterligare replikat enligt vad som är lämpligt.
5. För detta test rekommenderas syntetiskt sediment. Syntetiskt sediment har flera fördelar jämfört med naturliga sediment:
 - Variationen mellan testningar reduceras eftersom syntetiskt sediment bildar en reproducerbar "standardmatrix", och behovet av att få fram oförorenade och rena sediment elimineras.
 - Testningen kan inledas när som helst utan att beakta säsongvariationer i testsedimentet och det behövs ingen förbehandling av sediment för att få bort naturligt förekommande fauna. När syntetiskt sediment används uppstår heller inte kostnader för insamling på fältet av tillräckliga mängder sediment för rutintestning.
 - Användning syntetiskt sediment ger möjlighet till jämförelser av toxicitet och därmed klassificering av ämnen. Toxicitetsdata från tester med naturliga och syntetiska sediment har visat sig vara jämförbara för flera kemikalier (2).
6. Definitioner finns i tillägg 1.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

7. Första stadiets chironomidlarver exponeras för ett urval koncentrationer av testämnet i ett sediment-vatten-system. Testet inleds genom att tillsätta första stadiets larver i testbägare som innehåller ett sediment-vatten-system och därefter spika vattnet med testämnet. Kläckning av fullbildade myggor och utvecklingshastighet mäts i slutet av testet. Överlevande larver och deras vikt kan också mätas efter tio dagar om så krävs (med användning av ytterligare replikat enligt det som är lämpligt). Dessa data analyseras med användning av en regressionsmodell för att uppskatta den koncentration som skulle orsaka \times % minskning av antalet fullbildade myggor eller av larvernas överlevnad eller tillväxt (EC_{15} , EC_{50} osv.) eller genom användning av statistisk hypotesprövning för att bestämma NOEC/LOEC. För hypotesprövningen krävs en jämförelse mellan effektvärden och kontrollvärden med användning av statistiska test.

INFORMATION OM TESTÄMNET

8. Testämnets vattenlöslighet, ångtryck, uppmätt eller beräknad fördelning i sedimentet samt stabilitet i vatten och sediment bör vara kända. Det bör finnas en tillförlitlig analysmetod för kvantifiering av testämnet i överliggande vatten, porvatten och sediment med känd och rapporterad exakthet och detektionsgräns. Det är också bra att känna till testämnets strukturformel och renhet. Hur testämnet agerar kemiskt (t.ex. upplösning, abiotisk och biotisk nedbrytning osv.) hör också till den information som är användbar. Närmare vägledning för testning av ämnen vars fysikalkemiska egenskaper gör det svårt att genomföra detta test finns i (12).

REFERENSKEMIKALIER

9. Referenskemikalier kan testas periodiskt för att säkerställa att testprotokollet och testbetingelserna är tillförlitliga. Exempel på toxiska referensämnen som med framgång har använts i ringtest och valideringsstudier är lindan, trifluranid, pentaklorfenol, kadmiumklorid och kaliumklorid (1) (2) (5) (6) (13).

TESTETS GILTIGHET

10. För att testet ska vara giltigt gäller följande villkor:
 - Kläckningen av vuxna exemplar i kontrollkärlen måste vara minst 70 % i slutet av testet (1) (6).

- Kläckningen av vuxna exemplar av *C. riparius* och *C. yoshimatsui* i kontrollkärlen bör inträffa 12–24 dagar efter att de har införts i kärlen, för *C. tentans* krävs en period på 20–65 dagar.
- Vid slutet av testet bör pH och koncentrationen upplöst syre mätas i varje kärl. Syrekoncentrationen bör vara minst 60 % av luftmättnadsvärdet (ASV) vid den använda temperaturen och pH i överliggande vatten bör vara 6–9 i alla testkärl.
- Variationen i vattentemperatur får inte vara större än $\pm 1,0$ °C. Vattentemperaturen kan kontrolleras genom att göra testningen i ett isotermiskt utrymme, varvid rumstemperaturen bör kontrolleras med lämpliga tidsintervall.

METODBESKRIVNING

Testkärl

11. Testet görs i 600 ml-glasbägare med 8 cm i diameter. Även andra slags kärl kan användas, men då måste det gå att garantera att överliggande vatten och sediment har lämpliga djup. Sedimentytan bör vara tillräckligt stor för att ge 2–3 cm² per larv. Förhållandet mellan sedimentskiktets djup och överliggande vattnets djup bör vara 1:4. Testkärl och annan apparatur som kommer i kontakt med testsystemet bör vara gjorda av glas eller annat kemiskt inert material (t.ex. teflon).

Val av arter

12. Den art som används i testet ska helst vara *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* kan också vara lämplig, men den är svårare att hantera och kräver en längre testperiod. Även *Chironomus yohimatsui* kan användas. I tillägg 2 finns närmare uppgifter om odlingsmetoder för *Chironomus riparius*. Information om odlingsbetingelser finns också för andra arter, t.ex. *Chironomus tentans* (4) och *Chironomus yoshimatsui* (11). Arternas identifiering måste bekräftas före testningen men är inte nödvändig före varje test om organismerna härrör från en odling inom laboratoriet.

Sediment

13. Helst ska syntetiskt sediment användas. Om naturligt sediment används bör dess egenskaper bestämmas (minst pH, halten organiskt kol, och gärna även andra parametrar såsom förhållandet C/N och granulometri). Sedimentet måste även vara fritt från föroreningar och andra organismer som kan konkurrera med eller konsumera chironomiderna. Dessutom rekommenderas att naturligt sediment som är avsett att användas i ett chironomid-toxicitetstest konditioneras i sju dagar under samma betingelser som råder i det efterföljande testet. Följande syntetiska sediment, baserat på den syntetiska jord som används i testmetod C.8 (14) rekommenderas för detta test (1) (15) (16):
 - a) 4–5 % (torrvikt) torv så nära pH 5,5–6 som möjligt; det är viktigt att använda endast lufttorkad och finmalen torv i pulverform (partikelstorlek ≤ 1 mm).
 - b) 20 % (torrvikt) kaolinlera (kaolinithalt helst över 30 %).
 - c) 75–76 % (torrvikt) kvartssand (till största del bestående av fin sand där mer än 50 % av partiklarna har storleken 50–200 μ m).
 - d) Avjoniserat vatten tillsatt så att blandningen får en slutlig fukthalt på 30–50 %.
 - e) Kemiskt rent kalciumkarbonat (CaCO₃) tillsätts för att justera den slutliga sedimentblandningens pH till $7,0 \pm 0,5$.
 - f) Den slutliga blandningens kolhalt bör vara $2 \% \pm 0,5$ % och kan justeras med hjälp av lämpliga mängder torv och sand, enligt punkterna a och c.
14. Torv, kaolinlera och sand ska härröra från kända källor. Sedimentkomponenterna bör kontrolleras för att bekräfta avsaknaden av kemiska föroreningar (t.ex. tungmetaller, organiska klorföreningar, organiska fosforföreningar osv.) Ett exempel på hur syntetiskt sediment kan tillredas beskrivs i tillägg 3. Det är också godtagbart att blanda torra beståndsdelar om det går att demonstrera att tillsats av överliggande vatten inte leder till att sedimentets beståndsdelar separerar (t.ex. flytande torvpartiklar) och att torven eller sedimentet konditioneras tillräckligt.

Vatten

15. Allt vatten som uppfyller de kemiska kriterierna för godtagbart utspädningsvatten (se tilläggen 2 och 4) är lämpligt som testvatten. Allt lämpligt vatten, naturligt vatten (ytvatten eller grundvatten), rekonstituerat vatten (se tillägg 2) och avklorerat kranvatten är godtagbart som odlings- och testvatten om chironomiderna överlever i det under odling, acklimatisering och testning utan att uppvisa tecken på stress. Vid teststart ska testvattnets pH vara mellan 6 och 9 och totalhårdheten får inte vara högre än 400 mg/l uttryckt som CaCO₃. Om man misstänker växelverkan mellan hårdhetsjoner och testämnet, bör vatten med lägre hårdhet användas (i en sådan situation får Elendt Medium M4 inte användas). Samma typ av vatten bör användas under hela testningen. De vattenkvalitetssegenskaper som förtecknas i tillägg 4 bör mätas minst två gånger om året eller om man misstänker att egenskaperna har ändrats betydligt.

Stamlösningar – spikat vatten

16. Testkoncentrationerna beräknas på grundval av vattenkolumnens koncentrationer, dvs. det vatten som ligger över sedimentet. Testlösningar för de valda koncentrationerna bereds i regel genom utspädning av en stamlösning. Stamlösningarna ska helst beredas genom upplösning av testämnet i ett testmedium. I vissa fall kan det krävas lösningsmedel eller dispergeringsmedel för att få en stamlösning med lämplig koncentration. Exempel på lämpliga lösningsmedel är aceton, etanol, metanol, etylenglykolmonoetyleter, etylenglykoldimetyleter, dimetylformamid och trietylenglykol. Dispergeringsmedel som kan användas är Cremofor RH40, Tween 80, metylcellulosa 0,01 % och HCO-40. Lösningens koncentration i det slutliga testmediet bör vara minimal (t.ex. ≤ 0,1 ml/l) och bör vara samma för alla behandlingar. Om lösningsmedel används, får det inte ha någon betydande effekt på överlevnad eller synliga skadliga effekter på chironomidlarverna, vilket kan verifieras genom en kontroll med enbart lösningsmedel. Man bör dock in i det sista undvika att använda dessa medel.

TESTETS UTFORMNING

17. Testets utformning avser antalet koncentrationer och intervallen mellan dem, antalet kärl per koncentration och antalet larver per kärl. Här beskrivs utformningar för uppskattning av effektkoncentration, uppskattning av NOEC och för gränstest. Regressionsanalys rekommenderas för att testa hypotesen.

Utformning för regressionsanalys

18. Effektkoncentrationen (t.ex. EC₁₅, EC₅₀) och det koncentrationsområde som är relevant för testämnet bör omfattas av de koncentrationer som ingår i testet. Allmänt taget gäller att exaktheten och särskilt giltigheten för uppskattningar av effektkoncentrationer (EC_x) förbättras när effektkoncentrationen ligger inom området för de koncentrationer som testas. Extrapolering under lägsta positiva koncentration eller över högsta koncentration bör undvikas. Preliminära test kan användas för att hitta rätt koncentrationsområde (se punkt 27).
19. Om EC_x ska uppskattas bör testet omfatta minst fem koncentrationer och tre replikat för varje koncentration. Det är under alla omständigheter tillrådligt att använda tillräckligt många testkoncentrationer för att få en god modelluppskattning. Faktorn mellan koncentrationer bör inte vara större än två (undantag kan göras i fall där dos-responskurvan har liten lutning). Antalet replikat per behandling kan minskas om antalet testkoncentrationer med olika respons ökas. En ökning av antalet replikat eller minskning av testkoncentrationsintervall tenderar att leda till ett smalare konfidensintervall för testet. Ytterligare replikat krävs om en uppskattning ska göras av larvernas överlevnad och tillväxt under en tiodagarsperiod.

Upplägg för uppskattning av NOEC/NOEC

20. Om LOEC eller LOEC ska uppskattas bör det finnas fem testkoncentrationer med minst fyra replikat och faktorn mellan koncentrationerna får inte vara större än två. Antalet replikat bör vara tillräckligt för att säkerställa tillräcklig statistisk styrka för att upptäcka en skillnad på 20 % jämfört med kontrollen vid nivån 5 % för signifikans (p = 0,05). För uppskattning av utvecklingshastighet är det i regel lämpligt med variansanalys (ANOVA), såsom Dunns eller Williams test (17) (18) (19) (20). För kläckningsfrekvens kan ett Cochran-Armitage-test, Fishers exakta test (med Bonferronikorrigerings) eller ett Mantel-Haenszel-test användas.

Gränstest

21. Gränstest kan göras (en testkoncentration och kontroll) om inga effekter framkommit vid det preliminära testet för att fastställa testområde. Syftet med gränstest är att få indikation om att testämnets toxiska värde är högre än den testade gränskoncentrationen. Inga förslag på rekommenderade koncentrationer kan ges i denna testmetod, utan frågan måste bedömas av tillsynsmyndigheterna. I regel krävs minst sex replikat både för behandling och kontroll. Man måste kunna demonstrera tillräcklig statistisk styrka för att upptäcka en skillnad på 20 % jämfört med kontrollen vid nivån 5 % för signifikans (p = 0,05). Eftersom t-test ger kvantitativ respons (utvecklingshastighet och vikt) är t-test en lämplig statistisk metod förutsatt att data uppfyller testkraven (normalitet, homogena varianser osv.). Om dessa krav inte uppfylls kan man använda t-testet med olika varians eller ett icke-parametriskt test, såsom Wilcoxon-Mann-Whitneys test. För kläckningsfrekvens är det lämpligt att använda Fishers exakta test.

FÖRFARANDE

Exponeringsbetingelser

Beredning av systemet med spikat vatten och sediment

22. Lämpliga mängder syntetiskt sediment (se punkterna 13 och 14 och tillägg 3) tillförs testkärlet så att det bildas ett lager på minst 1,5 cm. Vatten tillsätts till ett djup på 6 cm (se punkt 15). Förhållandet mellan sedimentskiktets djup och vattenskiktets djup ska inte överskrida 1:4 och sedimentskiktet ska inte vara djupare än 3 cm. Systemet sediment-vatten bör hållas under skonsam luftning i sju dagar före tillsats av testorganismer (se punkt 14 och tillägg 3). För att undvika separation av sedimentets beståndsdelar och återsuspension av finfördelat material medan testvatten tillsätts i vattenkolumnen, kan sedimentet täckas med en plastplatta medan vattnet tillsätts, varefter plattan avlägsnas omedelbart. Även andra metoder kan vara lämpliga.
23. Testkärlen bör vara täckta (t.ex. med glasplattor). Vid behov fylls under testets gång vatten på till ursprunglig volym för att kompensera för avdunstning. Detta bör göras med destillerat eller avjoniserat vatten för att förebygga ackumulering av salter.

Tillförsel av testorganismer

24. Fyra till fem dagar innan testorganismerna tillförs testkärlen ska äggmassorna avlägsnas från odlingarna och placeras i små kärl i odlingsmedium. Åldrat medium från stamodling eller färskt berett medium kan användas. Om färskt medium används bör en liten mängd föda, t.ex. grönalger och/eller några droppar filtrat från en finmald suspension av fiskfoder i flingform tillsättas odlingsmediet (se tillägg 2). Endast färska äggmassor får användas. I regel börjar larverna kläckas några dagar efter att äggen har lagts (2–3 dagar för *Chironomus riparius* vid 20 °C och 1–4 dagar för *Chironomus tentans* vid 23 °C och *Chironomus yoshimatsui* vid 25 °C), och larvernas tillväxt sker i fyra stadier på 4–8 dagar per stadium. För testet ska första stadiets larver användas (2–3 eller 1–4 dagar efter kläckningen). Bestämning av larvstadium kan möjligen göras genom mätning av huvudkapseldiameter (6).
25. Tjugo första stadiets larver fördelas slumpvis till varje testkärn som innehåller spikat sediment och vatten, med användning av en trubbig pipett. Luftningen av vattnet måste stoppas medan larverna tillsätts testkärlen och hållas stoppad i ytterligare 24 timmar efter tillsättningen (se punkterna 24 och 32). Enligt det testupplägg som används (se punkterna 19 och 20) är antalet larver per testkoncentration minst 60 för uppskattning av EC-punkt och 80 för bestämning av NOEC.
26. Tjugofyra timmar efter tillsättning av larverna spikas den överliggande vattenkolumnen med testämnet, och en lätt luftning införs på nytt. Små volymer av testämnet tillsätts under vattenytan med hjälp av en pipett. Därefter görs försiktig omrörning av det överliggande vattnet utan att störa sedimentet.

Testkoncentrationer

27. Ett preliminärt test kan användas för att fastställa koncentrationerna för det definitiva testet. För detta ändamål används en serie brett spridda koncentrationer av testämnet. För att få samma ytdensitet per chironomid som ska användas för det slutliga testet, exponeras chironomiderna för varje koncentration av testämnet under en period som ger möjlighet att uppskatta lämpliga testkoncentrationer. Inga replikat krävs.
28. Testkoncentrationerna för det definitiva testet baseras på resultaten från det preliminära testet. Det ska finnas minst fem testkoncentrationer som väljs enligt beskrivningen i punkterna 18–20.

Kontrollkärl

29. Kontrollkärl som inte innehåller testämne utan enbart sediment bör ingå i testet med lämpligt antal replikat (se punkterna 19–20). Om lösningsmedel har använts för applicering av testämnet (se punkt 16) bör det också finnas kontrollkärl med sediment och lösningsmedel.

Testsystem

30. De system som används är statiska. Semistatiska system eller genomflödessystem med intermittent eller kontinuerlig förnyelse av överliggande vatten kan användas i undantagsfall, t.ex. om vattenkvalitetsspecifikationerna inte är lämpliga för testorganismen eller påverkar den kemiska jämvikten (t.ex. om syrenivåerna blir för låga, koncentrationen av utsöndrade produkter blir för hög eller om mineraler som släpps ut från sediment påverkar pH och/eller vattenhården). I regel är det dock tillräckligt och rekommendabelt att använda andra metoder för kompenserande av kvaliteten på överliggande vatten, såsom luftning.

Foder

31. Larverna bör ges foder helst dagligen eller minst tre gånger per vecka. Fiskfoder (suspension i vatten eller finmalt foder, t.ex. Tetra-Min eller Tetra-Phyll, se närmare i tillägg 2) i mängder om 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg för *C. yoshimatsui*) per larv per dag anses vara lämpligt för unga larver under de tio första dagarna. För äldre larver kan det krävas lite större mängd: 0,5–1 mg per larv och dag bör vara tillräckligt för återstoden av testet. Mängden bör minskas för alla behandlingar och kontroller om det uppstår svamptillväxt eller mortalitet observeras i kontrollerna. Om svamptillväxten inte kan stoppas måste testet upprepas. Vid testning av starkt adsorberande ämnen (t.ex. $\log K_{ow} > 5$) eller ämnen som är kovalent bundna till sedimentet, kan mängden foder som krävs för att säkerställa överlevnad och naturlig tillväxt för organismerna tillsättas i det syntetiska sedimentet före stabiliseringsperioden. Då ska växtmaterial användas i stället för fiskfoder, t.ex. 0,5 % (torrvikt) finmalda löv från t.ex. brännässla (*Urtica dioica*), mullbär (*Morus alba*), vitklöver (*Trifolium repens*), spenat (*Spinacia oleracea*) eller annat växtmaterial (*Cerophyl* eller *alfacellulosa*).

Inkubationsbetingelser

32. Skonsam luftning av överliggande vatten i testkärnen införs helst 24 timmar efter tillsättning av larverna och får pågå genom hela testet (se till att halten upplöst syre inte faller under 60 % av luftmättnadsvärdet ASV). Luftningen görs med hjälp av en Pasteur-glaspipett som är fäst 2–3 cm ovanför sedimentskiktet (en eller ett fåtal bubblor per sekund). Vid testning av flyktiga kemikalier kan man överväga att utesluta luftning av sediment-vattensystemet.
33. Testet genomförs vid konstant temperatur på 20 °C (± 2 °C). För *C. tentans* och *C. yoshimatsui* rekommenderas temperaturer på 23 °C respektive 25 °C (± 2 °C). En ljusperiod på 16 timmar används och ljusintensiteten ska vara 500–1 000 lux.

Exponeringstid

34. Exponeringen inleds när larver tillsätts i spikade kärn och kontrollkärn. Den maximala exponeringstiden är 28 dagar för *C. riparius* och *C. yoshimatsui* och 65 dagar för *C. tentans*. Om myggor kläcks tidigare, kan testet avslutas efter minst fem dagar efter att det sista vuxna exemplaret har kläckts i kontrollen.

OBSERVATIONER

Kläckning

35. Utvecklingstiden och totalantalet fullbildade han- och honmyggor bestäms. Hanarna är lätta att känna igen på sina fjäderantenner.
36. Testkärnen bör granskas visuellt minst tre gånger i veckan för att bedöma förekomsten av onormalt beteende (t.ex. exemplar som lämnar sedimentet, ovanligt simmande) jämfört med kontrollen. Under perioden för förväntad kläckning är det nödvändigt att dagligen räkna antalet kläckta exemplar. Kön och antal fullbildade exemplar registreras dagligen. Efter identifiering avlägsnas myggorna från kärnen. Ägg som har deponerats före testets slutförande bör registreras och därefter avlägsnas för att förhindra att larver på nytt introduceras i sedimentet. Likaså ska registrering göras av antalet synliga puppor som inte har kläckts. Vägledning om övervakning av kläckning finns i tillägg 5.

Tillväxt och överlevnad

37. Om det krävs data om överlevnad och tillväxt under en tiodagarsperiod bör ytterligare testkärn införlivas från början, så att dessa därefter kan användas. Larverna i sedimentet från dessa tilläggskärn tillvaratas genom sällning med ett 250 µm-säll. Kriterierna för död är orörlighet eller utebliven reaktion på mekanisk stimulans. Larver som inte tillvaratas bör räknas som döda (larver som har dött i början av testet kan ha sönderdelats av mikrober). Torrvikten (askfri) för överlevande larver per testkärn bestäms och den genomsnittliga individuella torrvikten per kärn beräknas. Det är bra att bestämma vilket stadium överlevande larver tillhör, och för detta kan mätning av huvudkapselns bredd användas.

Analytiska mätningar*Testämnes koncentration*

38. Som ett minimum bör prover av överliggande vatten, porvatten och sediment analyseras i början (helst inom en timme från tillsats av testämne) och i slutet av testet, för den högsta koncentrationen och för en lägre koncentration. Dessa bestämningar av testämneskoncentration ger information om testsubstansens beteende/fördelning i vatten-sedimentsystemet. Provtagning av sediment vid testets början kan påverka testsystemet (t.ex. genom att larver avlägsnas) och därför måste ytterligare testkärn användas för analytiska bestämningar vid testets

start samt under testets gång om så är lämpligt (se punkt 39). Mätningar i sedimentet är eventuellt inte nödvändiga om fördelningen av testämnet mellan vatten och sediment har fastställts tydligt under motsvarande betingelser (t.ex. förhållandet mellan sediment och vatten, typ av applicering, sedimentets halt av organiskt kol).

39. Om mellanliggande mätningar görs (t.ex. dag 7) och om det för analysen krävs stora prover som inte kan tas från testkärnen utan att testsystemet påverkas, bör de analytiska bestämningarna göras på prover som tas från extra testkärn som behandlas på samma sätt (inklusive förekomst av testorganismer) men som inte används för biologiska observationer.
40. Centrifugering vid t.ex. 10 000 g och 4 °C i 30 minuter är det rekommenderade förfarandet för att isolera porvatten. Om det har demonstrerats att testämnet inte adsorberas på filter kan även filtrering godtas. I vissa fall är det kanske inte möjligt att analysera koncentrationerna i porvattnet därför att provet är för litet.

Fysikalkemiska parametrar

41. Mätning bör göras av pH, upplöst syre i vattnet och temperatur i testkärnen på lämpligt sätt (se punkt 10). Hårdhet och ammonium bör mätas i kontrollerna och ett testkärn vid den högsta koncentrationen i början och slutet av testet.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

42. Syftet med detta test är att bestämma testämnets effekt på utvecklingshastigheten och totalantalet fullbildade han- och honmyggor eller, om det gäller ett tiodagarstest, effekterna på larvernas överlevnad och vikt. Om det inte finns indikationer på statistiskt avvikande känslighet för hanar och honor, kan resultaten poolas för statistiska analyser. Känslighetsskillnaderna mellan hanar och honor kan bedömas statistiskt t.ex. genom " χ^2 -r \times 2 table test". Larvernas överlevnad och genomsnittlig individuell torrsvikt per kärn måste bestämmas efter tio dagar där detta krävs.
43. Effektkoncentrationerna uttryckta som koncentrationer i överliggande vatten beräknas helst på grundval av uppmätta sedimentkoncentrationer vid testets början (se punkt 38).
44. För att beräkna en punktvis uppskattning av EC_{50} eller något annat EC_x -värde, kan statistiken per kärn användas som äkta replikat. Vid beräkning av konfidensintervallet för ett EC_x -värde bör variansen mellan kärn beaktas, eller så bör man påvisa att variansen är så liten att den kan ignoreras. Om modellen anpassas med minsta kvadratmetoden bör transformation tillämpas på den kärnvisa statistiken i syfte att förbättra variansens homogenitet. EC_x -värdena bör dock beräknas när responsen har transformerats tillbaka till det ursprungliga värdet.
45. När syftet med den statistiska analysen är att bestämma NOEC/LOEC genom hypotestestning, måste variansen mellan kärn beaktas, t.ex. genom nästad ANOVA. Alternativt kan mer robust testning (21) vara lämplig i situationer där de vanliga ANOVA-antagandena inte gäller.

Kläckningsfrekvens

46. Kläckningsfrekvenser är dikotoma (tvåpunktsfördelade) data och kan analyseras genom Cochran-Armitage test som tillämpas på step-down-grund där monoton dos-respons förväntas och dessa data stämmer överens med förväntningen. Om inte, kan Fishers exakta test eller ett Mantel-Haenszel-test med Bonferroni-Holm-korrigerade p-värden användas. Om det finns bevis på större variation mellan replikat inom samma koncentration än det som en binomial fördelning skulle indikera (ofta kallad extra-binomial fördelning), bör ett robust Cochran-Armitage-test eller Fischers exakta test användas, enligt det som föreslås i punkt 21.
47. Det totala antalet myggor som kläckts per kärn, n_e , bestäms och divideras med antalet tillsatta larver, n_a enligt följande:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

där:

ER = kläckningsfrekvensen

n_e = antalet myggor som kläckts per kärn

n_a = antalet larver som tillsatts per kärn

48. Ett alternativ som bäst lämpar sig för stora provstorlekar, när det finns extra-binomial varians, är att behandla kläckningsfrekvensen som en kontinuerlig respons och använda förfaranden såsom William-test när monoton dos-respons förväntas och stämmer överens med dessa data för kläckningsfrekvens. Dunnett-test är lämpligt i fall där det inte är hållbart med monotonicitet. I detta sammanhang definieras begreppet "stort prov" som ett prov där antalet kläckta och antalet inte kläckta överstiger fem, per replikatkärl.
49. Vid användning av ANOVA-metoder bör värdena för kläckningsfrekvens först transformeras genom arcsin-kvadratsrotstransformation eller Freeman-Tukeytransformation för att få en ungefärlig normalfördelning och jämna ut varianserna. Cochran-Armitage-test, Fishers exakta test (Bonferroni) eller Mantel-Haenszel-test kan användas när absoluta frekvenser används. För att göra arcsin-kvadratrotstransformation tar man inverterad sinus (\sin^{-1}) av kvadratrotten av kläckningsfrekvensen.
50. EC_x -värden för kläckningsfrekvenser beräknas med regressionsanalys (t.ex. probit (22), logit, Weibull, lämplig kommersiell mjukvara eller dylikt). Om regressionsanalysen inte lyckas (om det t.ex. finns mindre än två partiella responser) används andra icke-parametriska metoder såsom glidande medelvärde eller enkel interpolering.

Utvecklingshastighet

51. Med genomsnittlig utvecklingstid avses den genomsnittliga tidsomfattningen mellan tillsättning av larver (testdag 0) och kläckningen av den experimentella kohorten myggor (för beräkning av den faktiska utvecklingstiden bör man beakta larvernas ålder vid tillsättningstidpunkten). Värdet för utvecklingshastighet är det reciproka värdet av tidenheten för utveckling: (enhet: 1/dag) och representerar den andel larvutveckling som sker per dag. Utvecklingshastigheten är det mått som helst ska användas för utvärdering av dessa sedimenttoxicitetsstudier eftersom variansen är lägre och homogenare samt närmare normalfördelningen i jämförelse med utvecklingstiden. Kraftfulla parametriska testförfaranden kan alltså användas baserade på utvecklingshastighet hellre än på utvecklingstid. För utvecklingshastighet som en kontinuerlig respons kan EC_x -värden uppskattas med hjälp av regressionsanalys (t.ex. (23), (24)).
52. För efterföljande statistiska test antas antalet myggor observerade på inspektionsdag x ha kläckts i mitten av tidsintervallet mellan dag x och dag $x-1$ (l är inspektionsintervallets längd, i regel 1 dag). Genomsnittlig utvecklingshastighet per kärl (\bar{x}) beräknas enligt följande:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

där:

- \bar{x} : genomsnittlig utvecklingshastighet per kärl
i: index för inspektionsintervall
m: maximiantalet inspektionsintervall
 f_i : antalet myggor som kläckts under inspektionsintervallet *i*
 n_e : totalantalet myggor som kläckts i slutet av experimentet (= $\sum f_i$)
 x_i : utvecklingshastigheten för myggor som kläckts under intervallet *i*

$$x_i = \frac{1}{\left(\text{day}_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

där:

- day_i : inspektionsdag (dagar från appliceringen)
 l_i : inspektionsintervallets längd *i* (dagar, i regel 1 dag)

Testrapport

53. Testrapporten ska innehålla minst följande uppgifter:

Testämne:

- Fysikalisk natur och, där det är relevant, fysikalkemiska egenskaper (vattenlöslighet, ångtryck, fördelningskoefficient i jord (eller i sediment, om tillgänglig), stabilitet i vatten osv.).
- Kemiska identifieringsdata (trivialnamn, kemiskt namn, strukturformel, CAS-nummer osv.) samt renhet och analysmetod för kvantifiering av testämnet.

Testarter:

- Organismer som använts för testet: art, vetenskapligt namn, ursprung och odlingsbetingelser.
- Information om hantering av äggmassor och larver.
- Organismernas ålder när de tillförs testkärnen.

Testbetingelser:

- Sediment som använts (naturligt eller syntetiskt).
- För naturligt sediment, insamlingsplatsens belägenhet och beskrivning av sedimentet, inbegripet i mån av möjlighet föroreningshistoria och egenskaper: pH, halten organiskt kol, C/N-kvot och granulometri (om lämpligt).
- Beredning av syntetiskt sediment: beståndsdelar och egenskaper (halten organiskt kol, pH, fukthalt osv. vid testets början).
- Beredning av testvatten (om rekonstituerat vatten används) och egenskaper (syrehalt, pH, konduktivitet, hårdhet osv. vid testets början).
- Sedimentets och överliggande vattnets djup.
- Volymen för överliggande vatten och porvatten, vikten för vått sediment med och utan porvatten.
- Testkärn (material och storlek).
- Metod för beredning av stamlösningar och testkoncentrationer.
- Tillsättning av testämne: antalet koncentrationer, antalet replikat och, i förekommande fall, använt lösningsmedel.
- Inkubationsbetingelser: temperatur, ljuscykel och intensitet, luftning (frekvens och intensitet).
- Detaljerad information om utfodringen, inklusive typ av foder, beredning, mängd och utfodringschema.

Resultat:

- Nominella testkoncentrationer, uppmätta testkoncentrationer och resultaten av alla analyser för bestämning av testämnets koncentration i testkärn.
- Vattenkvaliteten i testkärnen – pH, temperatur, upplöst syre, hårdhet och ammonium.
- Ersättning av avdunstat testvatten, i förekommande fall.
- Antalet kläckta hon- och hanmyggor per kärn och dag.
- Antalet larver som inte utvecklats till myggor, per kärn.
- Genomsnittlig individuell torrsvikt för larver per kärn och per stadium, om lämpligt.
- Procentandel kläckta exemplar per replikat- och testkoncentration (han- och honmyggor poolade).
- Genomsnittlig utvecklingshastighet för fullbildade myggor per replikat och behandlingsnivå (han- och honmyggor poolade).
- Uppskattning av toxiska endpoints t.ex. EC_x (och associerade konfidensintervall), NOEC och/eller LOEC, och statistiska metoder som använts för bestämning av dem.
- Diskussion av resultaten, inbegripet inverkan på testresultatet som kan tillskrivas avvikelser från denna testmetod.

LITTERATUR

- (1) BBA (1995), "Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*. Development and validation of a new test system", redigerat av M. Streløkke och H. Köpp. Berlin 1995.
- (2) Fleming R. m.fl. (1994), "Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances", Slutlig rapport till Europeiska kommissionen, rapport nr EC 3738, augusti 1994, WRC, UK.
- (3) SETAC (1993), "Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments", WOSTA Workshop, Nederländerna.
- (4) ASTM International/E1706-00 (2002), "Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates", s. 1125–1241, *ASTM International 2002 Annual Book of Standards*, vol. 11.05, "Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides", ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (5) Environment Kanada (1997), "Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method", *Report SPE 1/RM/32*, december 1997.
- (6) US-EPA (2000), "Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates", andra utgåvan, *EPA 600/R-99/064*, mars 2000, revidering av första utgåvan juni 1994.
- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), "Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates".
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), "Chironomid Sediment toxicity Test".
- (9) Milani D., Day K. E., McLeay D. J. och Kirby R. S. (1996), "Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Kanada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*)" Technical Report, Environment Kanada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Kanada.
- (10) Sugaya Y. (1997), "Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*", *Jp. J. Sanit. Zool.* 48 (4), s. 345–350.
- (11) Kawai K. (1986), "Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera)", *Jp. J. Sanit. Zool.* 37 (1), s. 47–57.
- (12) OECD, 2000, "Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures", *OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Nr 23*.
- (13) Environment Kanada (1995), "Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant", *Report EPS 1/RM/30, september 1995*.
- (14) Kapitel C.8 i denna bilaga, Toxicitet hos dagmaskar.
- (15) Suedel B. C. och Rodgers J. H. (1994), "Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing", *Environ. Toxicol. Chem.* 13, s. 1163–1175.
- (16) Naylor C. och Rodrigues C., (1995), "Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment", *Chemosphere* 31, s. 3291–3303.
- (17) Dunnett C. W. (1964), "A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control", *J. Amer. Statist. Assoc.* 50, s. 1096–1121.

-
- (18) Dunnett C. W. (1964), "New tables for multiple comparisons with a control", *Biometrics*, 20, s. 482–491.
- (19) Williams D. A. (1971), "A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control", *Biometrics*, 27, s. 103–117.
- (20) Williams D. A. (1972), "The comparison of several dose levels with a zero dose control", *Biometrics*, 28, s. 510–531.
- (21) Rao J. N. K. och Scott A. J. (1992), "A simple method for the analysis of clustered binary data", *Biometrics* 48, s. 577–585.
- (22) Christensen E. R. (1984), "Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model", *Water Research* 18, s. 213–221.
- (23) Bruce och Versteeg (1992), "A statistical procedure for modelling continuous toxicity data", *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, s. 1485–1494.
- (24) Slob W. (2002), "Dose-response modelling of continuous endpoints", *Toxicol. Sci.* 66, s. 298–312.
-

Tillägg 1

DEFINITIONER

I denna testmetod gäller följande definitioner:

syntetiskt sediment: rekonstituerat, konstgjort sediment som är en blandning av material avsedda att efterlikna de fysiska beståndsdelarna i naturligt sediment.

överliggande vatten: det vatten som hålls ovanför sedimentet i testkärlet.

porvatten: det vatten som finns i mellanrummen mellan sediment- och jordpartiklar.

spikat sediment: sediment med tillsatt testämne.

testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

Tillägg 2

Rekommendationer för odling av *Chironomus riparius*

1. *Chironomus*-larver kan odlas i kristalliseringskärn eller stora behållare. Fin kvartssand sprids som ett tunt skikt på cirka 5–10 mm på behållarens botten. Även kiselgur (t.ex. Merck, Art. 8117) har visat sig vara ett lämpligt substrat (det räcker med ett tunt lager på några mm). Lämpligt vatten tillsätts till ett djup på flera cm. Vattennivåerna bör fyllas på efter behov för att ersätta avdunstning och förebygga uttorkning. Vattnet kan vid behov ersättas. Det bör finnas en skonsam luftning. De kärn som innehåller larver bör hållas i en lämplig bur som hindrar vuxna exemplar från att rymma. Buren bör vara tillräckligt stor för att de vuxna exemplaren ska kunna svärma, annars kan kopulation utebli (minimum är cirka 30 × 30 × 30 cm).
2. Burarna ska hållas i rumstemperatur eller ett tempererat utrymme vid 20 ± 2 °C med en ljusperiod på 16 timmar (intensitet ca 1 000 lux) och 8 timmar mörker. Det har rapporterats att luftfuktighet under 60 % RH kan hämma reproduktion.

Utspädningsvatten

3. Allt lämpligt naturligt eller syntetiskt vatten kan användas. Ofta används källvatten, avklorerat kravvatten och artificiella medier (t.ex. Elendt M4 eller M7, se nedan). Vattnet måste luftas före användningen. Vid behov kan odlingsvattnet förnyas genom att försiktigt hålla eller sifonera använt vatten från odlingskärnen utan att förstöra larvrören.

Utfodring av larver

4. *Chironomus*-larverna ges fiskfoder i flingform (Tetra Min®, Tetra Phyll® eller motsvarande patenterat märke), cirka 250 mg per kärn och dag. Fodret kan ges i form av torrt malet pulver eller som suspension i vatten: 1,0 g flingfoder blandas med 20 ml utspädningsvatten till en homogen blandning. Beredningen kan ges med en dosering på cirka 5 ml per kärn och dag (skaka om före användning). Äldre larver kan få en större dos.
5. Utfodringen justeras enligt vattenkvaliteten. Om odlingsmediet blir grumligt bör dosen sänkas. Foderdoseringen måste övervakas noggrant. För liten mängd leder till att larverna emigrerar mot vattenkolumnen och för stor mängd leder till ökad mikrobiell aktivitet och lägre syrekoncentrationer. Båda omständigheterna kan leda till minskad tillväxt.
6. Även celler av vissa grönalger (t.ex. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) kan tillsättas när nya odlingskärn läggs upp.

Utfodring av vuxna exemplar

7. Vissa testutövare har föreslagit att bomullskompresser indränkta i mättad sukroslösning kan användas som foder för vuxna exemplar.

Kläckning

8. Vid 20 ± 2 °C börjar vuxna exemplar kläckas i odlingskärnen efter cirka 13–15 dagar. Hanarna är lätta att känna igen på sina fjäderantennor.

Äggmassor

9. När vuxna exemplar finns i odlingsburen bör alla larver i odlingskärnen kontrolleras tre gånger per vecka för att se om gelatinösa äggmassor har deponerats. Om sådana upptäcks, bör de avlägsnas försiktigt. Äggmassorna överförs till ett litet kärn som innehåller ett prov av odlingsvattnet. De används sedan för att starta nya odlingskärn (t.ex. 2–4 äggmassor per kärn) eller för toxicitetstest.
10. Första stadiets larver bör kläckas efter 2–3 dagar.

Upplägning av nya odlingskärn

11. När odlingarna är etablerade bör det vara möjligt att lägga upp en färsk larvodling veckovis eller med längre intervall beroende på testningskraven, och avlägsna äldre kärn efter att vuxna myggor har kläckts. På detta sätt fås regelbunden tillgång till vuxna exemplar med minimal insats.

Beredning av testlösningarna M4 och M7

12. M4-mediet upptäcktes av Elendt (1990). M7-mediet bereds på samma sätt som M4-mediet med undantag för de ämnen som anges i tabell 1, för vilka koncentrationerna är fyra gånger lägre i M7 jämfört med M4. En publikation om M7-mediet är under arbete (Elendt, personlig kommunikation). Testlösningen ska inte beredas enligt Elendt och Bias (1990) eftersom de angivna koncentrationerna av $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 och K_2HPO_4 inte är lämpliga.

Beredning av M7-medium

13. Varje stamlösning (I) bereds individuellt och en kombinerad stamlösning (II) bereds av dessa stamlösningar (I) (se tabell 1). Femtio ml av den kombinerade stamlösningen (II) och de mängder av varje stamlösning med makronäring som anges i tabell 2 och avjoniserat vatten tillsätts upp till 1 liter för att bereda M7-mediet. En stamlösning med vitaminer bereds genom att tillsätta tre vitaminer till avjoniserat vatten enligt tabell 3, och 0,1 ml av den kombinerade vitaminstamlösningen tillsätts till det slutliga M7-mediet strax före användningen (vitaminstamlösningen förvaras djupfryst i små alikvoter). Mediet luftas och stabiliseras.

Tabell 1

Stamlösningar av spårelement för M4- och M7-medium

Stamlösningar (I)	Mängd (mg) som byggs upp till 1 liter med avjoniserat vatten	Beredning av kombinerad stamlösning (II): blanda följande mängder (ml) stamlösning (I) och bygg upp till 1 liter med avjoniserat vatten		Slutliga koncentrationer i testlösningarna (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl_2	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_6\text{O}$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Dessa ämnen avviker i M4 och M7, såsom anges ovan.

(2) Dessa ämnen bereds individuellt, blandas och autoklaveras omedelbart.

Tabell 2

Stamlösningar med makronäringsämnen för medium M4 och M7

	Mängd som byggs upp till 1 liter med avjoniserat vatten (mg)	Mängd stamlösning med makronäringsämnen som tillsätts för att bereda medium M4 och M7 (ml/l)	Slutliga koncentrationer i testlösningarna M4 och M7 (mg/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	293 800	1,0	293,8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246 600	0,5	123,3

	Mängd som byggs upp till 1 liter med avjoniserat vatten (mg)	Mängd stamlösning med makronäringsämnen som tillsätts för att bereda medium M4 och M7 (ml/l)	Slutliga koncentrationer i testlösningarna M4 och M7 (mg/l)
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ · 9H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2 740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	0,1	0,184

Tabell 3

Stamlösningar med vitaminer för medium M4 och M7

Alla tre vitaminlösningar kombineras till en enda vitaminstamlösning.

	Mängd som byggs upp till 1 liter med avjoniserat vatten (mg)	Mängd stamlösning med vitaminer som tillsätts för att bereda medium M4 och M7 (ml/l)	Slutliga koncentrationer i testlösningarna M4 och M7 (mg/l)
Tiaminhydroklorid	750	0,1	0,075
Cyanokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

LITTERATUR

BBA (1995), "Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system", redigerat av M. Streloke och H. Köpp. Berlin 1995.

Elendt, B. P. (1990), "Selenium Deficiency in Crustacean", *Protoplasma* 154, s. 25–33.

Elendt B. P. och Bias W. R.(1990), "Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*", *Water Research* 24 (9), s. 1157–1167.

Tillägg 3

BEREDNING AV SYNTETISKT SEDIMENT

Sedimentsammansättning

Syntetiskt sediment ska ha följande sammansättning:

Beståndsdel	Egenskaper	% av sedimentets torrsvikt
Torv	Sphagnum, så nära pH 5,5–6 som möjligt utan synliga växtrester och finfördelad (partikelstorlek ≤ 1 mm) och lufttorkad.	4–5
Kvartssand	Partikelstorlek: > 50 % av partiklarna bör ha storlek inom området 50–200 μm	75–76
Kaolinitlera	Kaolinithalt ≥ 30 %	20
Organiskt kol	Justeras genom tillsats av torv och sand	2 ($\pm 0,5$)
Kalciumkarbonat	CaCO_3 , pulveriserat, kemiskt rent	0,05–0,1
Vatten	Konduktivitet ≤ 10 $\mu\text{S/m}$	30–50

Beredning

Torven lufttorkas och mals ner till ett fint pulver. En suspension av behövlig mängd torvpulver i avjoniserat vatten bereds med effektiv homogeniseringsapparat. Suspensionens pH justeras till $5,5 \pm 0,5$ med CaCO_3 . Suspensionen konditioneras minst två dagar med skonsam omrörning vid 20 ± 2 °C, för att stabilisera pH och etablera en stabil mikrobiell komponent, varefter pH uppmäts på nytt och bör vara $6,0 \pm 0,5$. Torvsuspensionen blandas sedan med de övriga beståndsdelarna (sand och kaolinitlera) och avjoniserat vatten till ett homogent sediment med en vattenhalt som ger kring 30–50 procent torrsvikt av sediment. Därefter mäts den slutliga blandningens pH på nytt och justeras vid behov till 6,5–7,5 med CaCO_3 . Prover tas av sedimentet för att bestämma torrsvikten och halten organiskt kol. Likaså rekommenderas att det syntetiska sediment som ska användas i ett chironomidtoxicitetstest konditioneras före användningen i sju dagar i samma betingelser som råder i det efterföljande testet.

Förvaring

De torra beståndsdelarna för beredning av syntetiskt sediment kan lagras i ett torrt och svalt utrymme vid rumstemperatur. Berett (vått) sediment ska inte lagras för användning i test. Det bör användas omedelbart efter den 7 dagar långa konditioneringsperioden i slutet av beredningen.

LITTERATUR:

Kapitel C.8 i denna bilaga, Toxicitet hos dagmaskar.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998), "Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media", *Ecotox. and Environ. Safety* 39, s. 10–20.

Tillägg 4

Krav på kemiska egenskaper hos utspädningsvatten

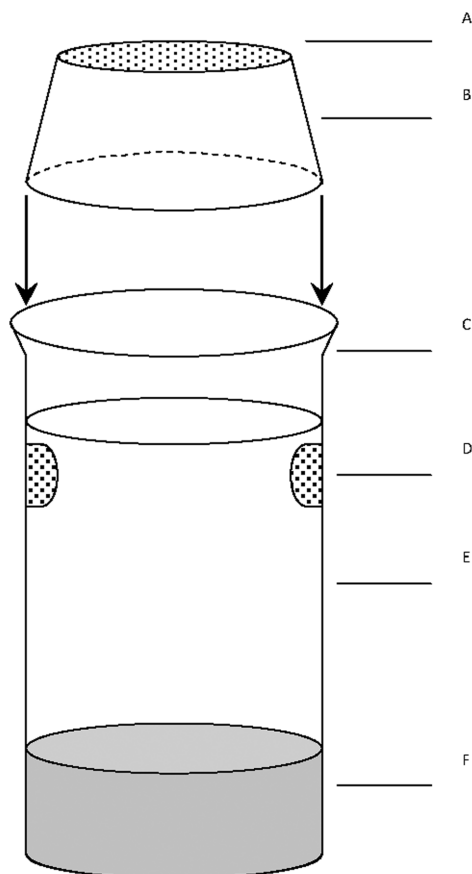
Ämne	Koncentrationer
Partikelinnehåll	< 20 mg/l
Totalt organiskt kol	< 2 mg/l
Ojoniserad ammoniak	< 1 µg/l
Hårdhet som CaCO ₃	< 400 mg/l (*)
Restklor	< 10 µg/l
Bekämpningsmedel med organiska fosforföreningar, totalt.	< 50 ng/l
Bekämpningsmedel med organiska klorföreningar plus polyklorerade bifenyl, totalt.	< 50 ng/l
Totalt organiskt klor	< 25 ng/l

(*) Här bör noteras att om man misstänker växelverkan mellan hårdhetsjoner och testämnet, bör vatten med lägre hårdhet användas (och i en sådan situation får Elendt Medium M4 inte användas).

Tillägg 5

Vägledning för övervakning av kläckning av chironomider

Fällor placeras på testbägarna. Dessa fällor behövs från dag 20 fram till testets slut. Exempel på en fälla visas nedan.



A: nylonnät
B: upp-och-nedvänd plastkopp
C: exponeringskärl utan läpp

D: filterportar för vattenutbyte
E: vatten
F: sediment

C.29 LÄTT BIONEDBRYTBARHET – CO₂ I FÖRSLUTNA KÄRL (Headspace-test)

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje 310 (2006). Denna testmetod är en screeningmetod för utvärdering av kemikaliers lättnedbrytbarhet och ger liknande information som de sex testmetoder som beskrivs i kapitel C.4 i denna bilaga A–F. En kemikalie som ger positiva testresultat med denna metod kan anses vara lätt bionedbrytbar och sönderfaller således snabbt i miljön.
2. Den väletablerade koldioxidmetoden (1) är baserad på Sturms ursprungliga test (2) för bestämning av organiska kemikaliers bionedbrytbarhet, genom mätning av koldioxid (CO₂) som produceras genom mikrobiell verksamhet, har i regel varit det första valet för testning av dåligt lösliga kemikalier och kemikalier med starkt adsorberande egenskaper. Testet väljs också för lösliga (men inte flyktiga) kemikalier, eftersom många anser att utveckling av koldioxid är det enda otvivelaktiga beviset på mikrobiell aktivitet. Avlägsnandet av upplöst organiskt kol kan påverkas av fysikalkemiska processer – adsorption, avdunstning, utfällning, hydrolys – såväl som av mikrobiell aktivitet och många icke-biologiska reaktioner som förbrukar syre; CO₂ produceras sällan

- från organiska kemikalier på abiotisk väg. I det ursprungliga och modifierade Sturmtestet (1) (2) avlägsnas CO₂ från vätskefasen till de absorberande kärnen genom s.k. sparging (luftbubblor får strömma genom vätskemediet för att avlägsna CO₂), medan Larsons version (3) (4) går ut på att överföra CO₂ från reaktionskärlet till absorberingsenheterna genom att låta CO₂-fri luft passera genom utrymmet ovanför vätskan samtidigt som testkärlet omskakas kontinuerligt. Omskakning av reaktionskärlet används endast i Larson-modifieringen, och omrörning anges endast för olösliga ämnen i ISO 9439 (5) och i den ursprungliga US-versionen (6), enligt vilka sparging rekommenderas hellre än ersättning av gasfasen. I en annan officiell US EPA-metod (8) baserad på Gledhill-metoden (8) hålls reaktionskärlet under omskakning och förseglat från atmosfären, och CO₂ som produceras samlas in i en intern alkalisk fälla direkt från gasfasen, på samma sätt som i klassiska Warburg/Barcroft-respirometerflaskor.
3. Det har dock visat sig att det för ett antal kemikalier ackumuleras oorganiskt kol i mediet vid användning av standard-Sturmtest i modifierad form (9). En koncentration på upp till 8 mg/l oorganiskt kol konstaterades under sönderfall av 20 mg C/l anilin. Uppsamling av CO₂ i alkaliska fällor gav således inte en äkta bild av mängden mikrobiologiskt producerad CO₂ vid mellanliggande tidpunkter under sönderfallet. Det medför att specifikationen om att minst 60 % av teoretisk maximal CO₂-produktion (ThCO₂) måste samlas upp inom ett tiodagarsfönster (de tio dagar som följer omedelbart efter att 10 % bionedbrytning har uppnåtts) för att en testkemikalie ska klassificeras som lätt bionedbrytbar, inte uppfylls för vissa kemikalier som skulle ges denna klassificering om man använder eliminering av upplöst organiskt kol (DOC).
 4. Om procentandelen sönderdelning är lägre än förväntat, är det möjligt att oorganiskt kol har ackumulerats i testlösningen. Då kan nedbrytbarheten bedömas med andra test för biologisk nedbrytbarhet.
 5. De övriga nackdelarna med Sturmtest (besvärligt, tidskrävande, högre risk för experimentella fel och kan inte användas för flyktiga kemikalier) har tidigare lett till sökning efter en teknik med förslutet kärl, annan än Gledhill, hellre än gasgenomflöde (10) (11). Boatman m.fl. (12) granskade de tidigare metoderna och valde ett system med slutet utrymme ovan för vätskeytan där CO₂ frigjordes till detta utrymme i slutet av inkubationen genom försurning av mediet. CO₂ uppmättes med gaskromatografi (GC)/IC i automatiskt tagna prover i gasutrymmet, medan upplöst oorganiskt kol (DIC) i vätskefasen inte beaktades. Likaså var de kärl som användes mycket små (20 ml) med endast 10 ml medium, vilket orsakade problem t.ex. vid tillsättning av de mycket små mängderna av olösliga testkemikalier, och/eller eventuellt fanns det inte tillräckliga mängder eller inga mikroorganismer i det inokulerade mediet som kunde sönderbryta testkemikalierna.
 6. Dessa svårigheter har lösts genom oberoende studier gjorda av Struijs och Stoltenkamp (13) samt av Birch och Fletcher (14), där de senare byggde på erfarenheter med apparatur använd i test för anaerob biologisk nedbrytning (15). I den tidigare metoden (13) mäts CO₂ i utrymmet ovanför vätskan efter försurning och jämvikt, medan den senare metoden (14) innebär att man mäter DIC i både gas- och vätskefaserna, utan behandling; över 90 % av bildat oorganiskt kol fanns i vätskefasen. Båda metoderna har fördelar jämfört med Sturmtest, i den mening att testsystemet är mera kompakt och lätthanterligt, flyktiga kemikalier kan testas och man undviker risken för fördröjning vid mätning av producerad CO₂.
 7. De två principerna kombinerades i ISO Headspace CO₂ Standard (16) som ringtestades (17) och denna standard utgör grunden för den testmetod som beskrivs här. De två principerna har också använts i US EPA-metoden (18). Två metoder för mätning av CO₂ har rekommenderats – CO₂ i utrymmet ovanför vätskan (headspace) efter försurning (13) och oorganiskt kol i vätskefasen efter tillförsel av överskottsalkali. Den senare metoden infördes av Peterson under CONCAWE-ringtestet (19) av denna headspace-metod som modifierats till att mäta lätt biologisk nedbrytbarhet. De ändringar som gjordes vid 1992 års revidering (20) av metoden i kapitel C.4 i denna bilaga om lätt bionedbrytbarhet har införlivats i denna testmetod, så att betingelserna (medium, tidslängd osv.) för övrigt är desamma som betingelserna i det reviderade Sturmtestet (20). Birch och Fletcher (14) har visat att de resultat som erhöles med detta headspace-test är mycket lika de resultat som erhöles med samma kemikalier i OECD-ringtest (21) av de reviderade testmetoderna.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

8. Testkemikalien, i regel 20 mg C/l, såsom enda källa för kol och energi, inkuberas i ett buffert-mineralsaltmedium som har inokulerats med en blandad population mikroorganismer. Testet genomförs i förslutna flaskor med ett luftutrymme ovanför vätskan som syrekälla för aerob biologisk nedbrytning. Utvecklingen av CO₂ till följd av fullständig aerob biologisk nedbrytning av testkemikalien bestäms genom att mäta den mängd oorganiskt kol som produceras i testflaskorna utöver den mängd som produceras i kontrollkärl för bakgrundsvärde som endast innehåller inokulerat medium. Graden av biologisk nedbrytning uttrycks som en procentandel av den teoretiska maximiproduktionen av oorganiskt kol (ThIC), jämfört med den mängd testkemikalie (i form av organiskt kol) som tillfördes i början.
9. DOC-elimineringen och/eller graden av primär biologisk nedbrytning av testkemikalien kan också mätas (20).

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

10. Testkemikaliens halt av organiskt kol (viktprocent) måste vara känd, antingen på grundval av den kemiska strukturen eller genom mätning, så att den procentuella nedbrytningen kan beräknas. För flyktiga testkemikalier kan uppmätt eller beräknad Henrys lags konstant användas för beräkning av lämplig kvot mellan utrymmet ovanför vätskan och vätskevolymen. Information om testkemikaliens toxicitet för mikroorganismer kan användas för att välja en lämplig testkoncentration och för tolkning av resultat som tyder på dålig biologisk nedbrytbarhet – inhibitionskontroll rekommenderas om det inte är känt att testkemikalien inte inhiberar mikrobiella aktiviteter (se punkt 24).

METODENS LÄMPLIGHET

11. Testmetoden kan användas för vattenlösliga och olösliga testkemikalier; god dispergering av testkemikalien bör säkerställas. Med användning av den rekommenderade kvoten på 1:2 mellan utrymmet ovanför vätskan och vätskevolymen kan flyktiga kemikalier med en Henrys lags konstant upp till $50 \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$ testas eftersom andelen testkemikalie i utrymmet ovanför vätskan inte överskrider 1 % (13). Ett mindre utrymme ovanför vätskan kan användas vid testning av kemikalier som är flyktigare, men deras biotillgänglighet kan utgöra en begränsning, särskilt om de har dålig löslighet i vatten. Man bör dock se till att kvoten mellan utrymmet ovanför vätskan och vätskevolymen samt testkemikaliens koncentration ger tillgång till tillräckligt med syre för att fullständig aerob bionedbrytning ska kunna ske (t.ex. genom att undvika en hög substratkoncentration och för liten volym ovanför vätskan). Vägledning om detta finns i (13) och (23).

REFERENSKEMIKALIER

12. I syfte att kontrollera testförfarandet bör en testkemikalie med känd biologisk nedbrytbarhet testas parallellt. För detta ändamål kan anilin, natriumbensoat eller etylenglykol användas vid testning av vattenlösliga testkemikalier och 1-oktanol för testkemikalier med dålig löslighet. Referenskemikaliernas biologiska nedbrytbarhet bör nå upp till mer än 60 % av ThC inom 14 dagar.

REPRODUCERBARHET

13. Vid ISO-ringtest av metoden (17) erhöles följande resultat i rekommenderade betingelser, i vilket ingick 20 mg C testkemikalie/l.

Testkemikalie	Medelvärde för procentuell biologisk nedbrytning (28 d)	Variationskoefficient (%)	Antal laboratorier
Anilin	90	16	17
1-oktanol	85	12	14

Variationen mellan tester (replikerbarhet) med användning av anilin var låg, med variationskoefficienter under 5 % för de flesta testningskörningar. I de två fall där replikerbarheten var sämre berodde den större variationen sannolikt på hög produktion av oorganiskt kol i kontrollkärlen för bakgrundsvärde. Replikerbarheten var sämre med 1-oktanol men var fortfarande lägre än 10 % för 79 % av testkörningarna. Denna större variation mellan tester kan ha berott på doseringsfel, eftersom en liten volym (3–4 µl) 1-oktanol måste injiceras i de förslutna testflaskorna. Variationskoefficienterna kan bli högre när lägre koncentrationer av testkemikalie används, särskilt vid koncentrationer under 10 mg C/l. Detta kan delvis lösas genom att sänka koncentrationen totalt oorganiskt kol (TIC) i inokulatet.

14. I ett EU-ringtest (24) med fem yaktiva ämnen tillsatta såsom 10 mg C/l erhöles följande testresultat:

Testkemikalie	Medelvärde för procentuell biologisk nedbrytning (28 d)	Variationskoefficient (%)	Antal laboratorier
Tetrapropylen Bensensulfonat	17	45	10
Di-iso-oktylsulfo-succinat (anioniskt)	72	22	9
Hexadekyl-trimetyl (*) Ammoniumklorid (katjoniskt)	75	13	10

Testkemikalie	Medelvärde för procentuell biologisk nedbrytning (28 d)	Variationskoefficient (%)	Antal laboratorier
Iso-nonylfenol-(etoxylat) ₉ (icke-joniskt)	41	32	10
Cocoamido-propylbetain (amfoteriskt)	60	23	11

(*) SiO₂ tillsattes för att neutralisera toxicitet.

Resultaten tyder på att variationen allmänt taget var högre för de ytaktiva ämnen som hade sämre nedbrytning. Variationen mellan tester var mindre än 15 % för över 90 % av fallen, och den högsta variationen var 30–40 %.

ANMÄRKNING: De flesta ytaktiva ämnen har inte enhetlig molekylär struktur utan är blandningar av isomerer, homologer osv. som sönderfaller efter olika långa lagfaser och med olika kinetiska hastigheter, vilket resulterar i lägre kurvor, dvs. gränsvärdet på 60 % kanske inte nås inom tiodagarsfönstret, även om varje enskild molekylär enhet skulle nå detta värde vid testning för sig. Detta kan även observeras med andra komplexa blandningar.

METODBESKRIVNING

Apparatur

15. Normal laboratorieapparatur och följande:

- a) Glasserumflaskor, förseglade med butylgummiproppar och kapsyllock av aluminium. Rekommenderad storlek är '125 ml' som har en total volym på cirka 160 ml (i detta fall bör man försäkra sig om att volymen för var och en flaska är 160 ± 1 ml. Mindre kärl kan användas om resultaten uppfyller de villkor som beskrivs i punkterna 66 och 67.
- b) Kolanalysator eller annat instrument (t.ex. gaskromatograf) för mätning av oorganiskt kol.
- c) Högpresionssprutor för gas- och vätskeformiga prover.
- d) Orbitalt skakbord i temperaturkontrollerad omgivning.
- e) Tillförsel av CO₂-fri luft – kan ordnas genom att låta luft flöda genom kalk-soda-granulat eller genom att använda en gasblandning av 80 % N₂ och 20 % O₂ (frivilligt) (se punkt 28).
- f) Membranfiltreringsutrustning med 0,20–0,45 µm porstorlek (frivilligt).
- g) Analysutrustning för organiskt kol (frivilligt).

Reagenser

16. Alla reagenser som används ska vara av analytisk renhetsgrad.

Vatten

17. Destillerat eller avjoniserat vatten ska användas med ≤ 1 mg/l som totalt organiskt kol. Detta representerar ≤ 5 % av det ursprungliga organiska kol som tillförs genom den rekommenderade dosen testkemikalie.

Stamlösningar av mineralsaltmediet

18. Stamlösningar och mineralsaltmedium liknande de i testerna ISO 14593 (16) och C.4 för lätt biologisk nedbrytbarhet (20) ska användas. En högre koncentration av ammoniumklorid (2,0 g/l i stället för 0,5 g/l) är endast nödvändigt i särskilda undantagsfall, t.ex. när koncentrationen testkemikalie överstiger 40 mg C/l. Stamlösningarna bör förvaras i kylskåp och slängas efter sex månader, eller tidigare om det finns tecken på fällning eller mikrobiell tillväxt. Följande stamlösningar ska beredas:

a) Kaliumdivätefosfat (KH_2PO_4) 8,50 g

Dikaliumvätefosfat (K_2HPO_4) 21,75 g

Dinatriumvätefosfatdihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 33,40 g

Ammoniumklorid (NH_4Cl) 0,50 g

Lös upp i vatten och fyll upp till 1 liter. Lösningens pH bör vara 7,4 ($\pm 0,2$). Om inte, bered en ny lösning.

b) Kalciumkloriddihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 36,40 g

Lös upp i vatten och fyll upp till 1 liter.

c) Magnesiumsulfatheptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 22,50 g

Lös upp i vatten och fyll upp till 1 liter.

d) Järn(III)kloridhexahydrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0,25 g

Lös upp i vatten och fyll upp till 1 liter och tillsätt en droppe koncentrerad väteklorid.

Beredning av mineralmedium

19. Blanda 10 ml av lösning a med cirka 800 ml vatten (punkt 17), tillsätt 1 ml av lösningarna b, c och d och fyll upp till 1 liter med vatten (punkt 17).

Övriga reagenser

20. Koncentrerad ortofosforsyra (H_3PO_4) (> 85 % massa per volym).

Natriumhydroxidlösning 7 M

21. Lös upp 280 g natriumhydroxid (NaOH) i 1 liter vatten (punkt 17). Bestäm DIC-koncentrationen i denna lösning och beakta värdet vid beräkning av testresultaten (se punkterna 55 och 61), särskilt med tanke på giltighetskriteriet enligt punkt 66 b. Bered en ny, färsk lösning om koncentrationen DIC är för hög.

Testkemikalie

22. Bered en stamlösning av en tillräckligt vattenlöslig kemikalie i vatten (punkt 17) eller i testmedium (punkt 19) i en koncentration som helst är 100-faldig jämförd med den koncentration som ska användas i testet; det kan vara nödvändigt att justera stamlösningens pH. Stamlösning tillförs mineralmediet så att den slutliga halten av organiskt kol blir mellan 2 och 40 mg C/l, helst 20 mg C/l. Om lägre koncentrationer används kan precisionen bli lidande. Lösliga och olösliga vätskeformiga kemikalier kan tillsättas i kärnen direkt med hjälp av högprecisionsprutor. För dåligt lösliga och olösliga testkemikalier kan det krävas specialbehandling (25). Det finns följande alternativ:

a) Direkt tillsättning av kända vägda mängder.

b) Dispergering med ultraljud före tillsättning.

c) Dispergering med hjälp av emulgeringsmedel som krävs för att fastställa huruvida de har inhiberande eller stimulerande effekter på den mikrobiella aktiviteten före tillsättning.

d) Adsorption av vätskeformig testkemikalie eller lösning i ett lämpligt flyktigt lösningsmedel, på ett annat medium eller underlag (t.ex. glasfiberfilter), och därefter avdunstning av lösningsmedlet om sådant använts och direkt tillsättning av kända mängder.

e) Tillsättning av känd mängd av en lösning av testkemikalien i ett lättflyktigt lösningsmedel i ett tomt testkärl, och därefter avdunstning av lösningsmedlet.

Medel eller lösningsmedel som används i c, d och e måste ha testats för stimulerande eller inhiberande effekt på mikrobiell aktivitet (se punkt 42 b).

Referenskemikalie

23. Bered en stamlösning av (löslig) testkemikalie i vatten (punkt 17) i en koncentration som helst är 100-faldig i jämförelse med den slutliga koncentration som ska användas (20 mg C/l) i testet.

Inhibitionskontroll

24. Det händer ofta att testkemikalier inte uppvisar någon betydande nedbrytning under de betingelser som används för bedömning av lätt bionedbrytbarhet. En tänkbar orsak är att testkemikalien fungerar inhiberande på inokulatet vid den koncentration som används i testet. Inhibitionskontroll kan införlivas i testutformningen för att göra det möjligt att (i efterhand) identifiera inhibering som en möjlig orsak eller bidragande faktor. Alternativt kan man med hjälp av inhibitionskontrollen utesluta sådana störningar och påvisa att ingen eller svag nedbrytning endast beror på motstånd mot mikrobiell attack i testbetingelserna. För att få information om testkemikalies toxicitet för (aeroba) mikroorganismer) bereds en lösning i testmediet med testkemikalien och referenskemikalien (punkt 19), var och en i samma koncentration som tillsatt koncentration (se punkterna 22 och 23).

Inokulat

25. Inokulatet kan härröra från ett flertal källor: aktiverat slam, avloppsvatten (oklorerat), ytvatten och jordar eller från en blandning av dessa (20). Källans bionedbrytningsaktivitet bör kontrolleras med hjälp av en referenskemikalie. Oavsett källa bör mikroorganismer som tidigare exponerats för testkemikalien inte användas om förfarandet är avsett att användas som ett test för lätt bionedbrytbarhet.

Varning: Aktiverat slam, avlopp och avloppsutflöde innehåller patogena organismer och måste hanteras försiktigt.

26. Erfarenheter har visat att den optimala volymen för inokulat är en volym som

- är tillräcklig för att ge en tillbörlig bionedbrytningsaktivitet,
- ger tillräcklig nedbrytning av referenskemikalien (se punkt 66),
- ger 10^2 till 10^5 kolonibildande enheter per milliliter i den slutliga blandningen,
- i regel ger en koncentration på 4 mg/l suspenderade fasta ämnen i den slutliga blandningen när aktiverat slam används; koncentrationer upp till 30 mg/l kan användas men då uppstår betydlig ökning av CO_2 -produktionen i kontrollkärlen för bakgrundsvärde (26),
- bidrar till mindre än 10 % av ursprungskoncentrationen av organiskt kol som tillförs genom testkemikalien,
- i regel är 1–10 ml inokulat per 1 liter testlösning.

Aktiverat slam

27. Aktiverat slam tas i färsk form från luftningstanken i ett reningsverk eller en enhet i laboratorieskala som i huvudsak behandlar avlopp från hushåll. Vid behov kan grova partiklar avlägsnas genom sållning (t.ex. 1 mm²) och slammet bör hållas aerobt fram till att det används.
28. Alternativt kan slammet efter eliminering av grova partiklar få sedimentera eller slammet centrifugeras (t.ex. 1 100 × g i 10 minuter). Avlägsna supernatantvätskan. Slammet kan tvättas i minerallösningen. Det koncentrerade slammet suspenderas i mineralmediet till en koncentration på 3–5 g suspenderade fasta ämnen per liter. Detta hålls under luftning tills att det används.
29. Slammet bör tas från ett effektivt fungerande konventionellt reningsverk. Om slam måste tas från ett high rate-reningsverk (högre belastningsgrad och kortare retentionstider) eller kan förmodas innehålla inhibitorer, bör det tvättas. Sedimentera eller centrifugera det återsuspenderade slammet efter grundlig blandning, avlägsna överstående vätska och suspendera tvättat slam på nytt i en ny volym av mineralmedium. Upprepa förfarandet tills att slammet anses vara fritt från överflödigt substrat eller inhibitor.
30. Efter fullständig återsuspension eller, om det gäller obehandlat slam, ta ett prov strax före användning för bestämning av torrvikten för suspenderade fasta ämnen.

31. Ett annat alternativ är att homogenisera aktiverat slam (3–5 g suspenderade fasta ämnen/l). Behandla slammet i en Waring-blandare i 2 minuter på medelhastighet. Låt det blandade slammet sätta sig i 30 minuter eller vid behov längre och dekantera vätskan för användning som inokulat (cirka 10 mg/l mineralmedium).
32. Ytterligare minskning av CO₂-utveckling i kontrollprovet för bakgrundsvärde kan fås genom att lufta slammet över natten med CO₂-fri luft. Använd 4 mg/l fasta ämnen från aktiverat slam som koncentration för inokulatet i detta test (13).

Sekundärt avloppsutflöde

33. Alternativt kan inokulat tas från sekundärt utflöde från ett reningsverk eller en enhet i laboratorieskala som i huvudsak tar emot avloppsvatten från hushåll. Håll provet under aeroba förhållanden och använd det samma dag som det tagits eller gör vid behov förkonditionering. Utflödet filtreras genom ett grovfilter för att avlägsna stora partiklar och därefter mäts pH.
34. För att minska halten oorganiskt kol gör sparging av filtratet med CO₂-fri luft (punkt 15 e) i 1 timme medan pH hålls på 6,5 med hjälp av ortofosforsyra (punkt 20). Därefter återställs pH-värdet till det ursprungliga med natriumhydroxid (punkt 21) och efter sedimentering cirka 1 timme tas en lämplig volym av supernatanten för inokulering. Genom sparging reduceras inokulatets halt av oorganiskt kol. Om t.ex. den maximala rekommenderade volymen av filtrerat utflöde som genomgått sparging (100 ml) per liter vatten använts som inokulat, är mängden oorganiskt kol i kontrollkärlen för bakgrundsvärde mellan 0,4 till 1,3 mg/l (14), vilket representerar 2–6,5 % av testkemikalens kol vid 20 mg C/l och 4–13 % vid 10 mg C/l.

Ytvatten

35. Ett prov tas av lämpligt ytvatten. Provet bör hållas i aeroba förhållanden och användas samma dag som det tas. Vid behov bör provet koncentreras genom filtrering eller centrifugering. Den volym inokulat som används i vart och ett testkärl bör bestämmas enligt kriterierna i punkt 26.

Jordar

36. Ett prov tas av lämplig jord på ned till 20 cm djup från jordytan. Stenar, växtrester och invertebrater bör avlägsnas från jordprovet innan det sällas genom 2 mm maskor (vid behov kan provet torkas lite om det är vått för sällning). Provet bör hållas under aeroba förhållanden och användas samma dag som det tas (om provet transporteras i en löst sluten polyetenpåse kan det förvaras vid 2–4 °C upp till en månad).

Förkonditionering av inokulat

37. Inokulatet kan förkonditioneras för försöksförhållandena men får inte förpassas till testkemikalien. Genom förkonditionering kan man minska bakgrundsutveckling av CO₂ i kontrollkärlen. Förkonditionering innebär att aktiverat slam luftas efter utspädning i testmediet till 30 mg/l med fuktig CO₂-fri luft upp till 5–7 dagar vid testtemperatur.

TESTFÖRFARANDE

Antal flaskor

38. Antalet flaskor (se punkt 15 a) som behövs för ett test beror på analysfrekvensen och testets tidslängd.
39. Det rekommenderas att ett triplikat flaskor analyseras efter ett tillräckligt antal tidsintervall så att tiodagarsfönstret kan fastställas. Minst fem testflaskor (se punkt 15 a) från uppsättningarna a, b och c (se punkt 42) analyseras i slutet av testet, som grund för beräkning av 95 %-konfidensintervall för den genomsnittliga procentuella biologiska nedbrytningen.

Inokulerat medium

40. Inokulatet används vid en koncentration på 4 mg/l aktiverat slam räknat som torrsvikt. Bered omedelbart före användning tillräcklig mängd inokulerat medium genom tillsättning av t.ex. 2 ml lämpligt behandlat aktiverat slam (se punkterna 27–32) med 2 000 mg/l till 1 liter mineralsaltmedium (se punkt 19). När sekundärt avloppsutflöde ska användas, tillsätt upp till 100 ml utflöde (se punkt 33) till 900 ml mineralsaltmedium (se punkt 19) och späd till 1 liter med medium.

Beredning av flaskor

41. Alikvoter av inokulerat medium doseras till replikatflaskor så att kvoten mellan ovanförliggande utrymme och vatten är 1:2 (tillsätt t.ex. 107 ml till flaskor med 160 ml kapacitet). Andra kvoter kan användas, men se varningarna i punkt 11. Oavsett vilken typ av inokulat som används är det viktigt att se till att det inokulerade mediet blandas tillräckligt för att säkerställa enhetlig fördelning i testflaskorna.
42. Flaskuppsättningarna (punkt 15 a) bereds enligt följande:
 - a) Testkärl (betecknade F_T) som innehåller testkemikalie.
 - b) Kontrollkärl för bakgrundsvärde (betecknade F_B) som endast innehåller testmedium plus inokulat; likaså måste alla eventuella kemikalier, lösningsmedel, agenter eller glasfiberfilter som används för att införa testkemikalien i testkärlen tillsättas.
 - c) Kärl (betecknade F_C) för kontroll av förfarandet med referenskemikalien.
 - d) Vid behov, kärl (betecknade F_I) för kontroll av eventuell inhiberande effekt från testkemikalien som innehåller både testkemikalie och referenskemikalie vid samma koncentrationer (punkt 24) som i flaskorna F_T och F_C .
 - e) Kärl (betecknade F_S) för kontroll av eventuell abiotisk sönderdelning som i led a plus 50 mg/l $HgCl_2$ eller steriliserade på annat sätt (t.ex. i autoklav).
43. Vattenlösliga testkemikalier och referenskemikalier tillsätts som vattenbaserade stamlösningar (punkterna 22, 23 och 24) så att koncentrationer på 10–20 mg C/l erhålls.
44. Olösliga testkemikalier och olösliga referenskemikalier tillsätts flaskorna på olika sätt (se punkt 22 a–e) beroende på testkemikalien natur, antingen före eller efter tillsättning av inokulerat medium, beroende på metoden för behandling av testkemikalien. Om något av de förfaranden som anges i punkt 22 a–e används ska kontrollflaskorna för bakgrundsvärde F_B (punkt 42 b) behandlas på samma sätt, men testkemikalien och referenskemikalien utesluts.
45. Flyktiga testkemikalier ska injiceras i förslutna flaskor (punkt 47) med användning av mikrospruta. Dosen beräknas utifrån injicerad volym och testkemikalien densitet.
46. Vid behov bör vatten tillsättas, för att få samma vätskevolym i varje kärl. Det är viktigt att se till att kvoten mellan utrymmet ovanför vätskan och vätska (i regel 1:2) och koncentrationen testkemikalie är sådana att det finns tillräckligt med syre i utrymmet ovanför vätskan för fullständig biologisk nedbrytning.
47. Därefter förseglas alla flaskor med t.ex. butylgummipropp (septum) och kapsyllock av aluminium. Om flyktiga kemikalier testas, tillsätts de i detta skede (punkt 45). Om övervakning ska göras av DOC-koncentrationsminskningen i testlösning och tidpunkt noll-analyser görs för ursprunglig koncentration av oorganiskt kol (sterila kontroller, punkt 43 e) eller andra determinanter, tas ett lämpligt prov från testkärlet. Därefter slängs testkärlet och dess innehåll.
48. De förslutna flaskorna placeras på ett roterande skakbord (punkt 15 d) där skakhastigheten är tillräcklig för att hålla flaskornas innehåll väl blandat och suspenderat (t.ex. 150–200 rpm), och inkuberas i mörker vid 20 °C som bör hållas inom ± 1 °C.

Provtagning

49. Provtagnings-schemat beror på lagperioden och den kinetiska hastigheten för testkemikalien biologiska nedbrytning. Flaskorna tas för analys på provtagningsdagen, och provtagning bör göras minst varje vecka eller oftare (t.ex. två gånger i veckan) om en fullständig nedbrytningskurva önskas. Behövt antal replikatflaskor tas från skakbordet så att F_T , F_B och F_C representeras, och, i förekommande fall F_I och F_S (se punkt 42). Testperioden är normalt 28 dagar. Om bionedbrytningskurvan tyder på att plattfasen har nåtts tidigare än efter 28 dagar, kan testet avslutas tidigare. Ta prover från de fem flaskor som reserverats för testdag 28 för analys, och använd resultaten för att beräkna konfidensintervall eller variationskoefficient för procentandelen biologisk nedbrytning. Provtagning från flaskor som representerar kontrollerna av inhibering och abiotisk nedbrytning behöver inte göras lika ofta som för de övriga flaskorna – dag 1 och dag 28 är tillräckligt.

Analys av oorganiskt kol

50. CO₂-produktionen i flaskorna bestäms genom att mäta ökningen av koncentrationen oorganiskt kol under inkubationen. Det finns två metoder som rekommenderas för mätning av mängden oorganiskt kol som produceras under testet; dessa beskrivs nedan. Eftersom metoderna kan ge något avvikande resultat, bör endast en av metoderna användas vid en testkörning.
51. Metod a rekommenderas om mediet sannolikt innehåller rester av t.ex. glasfilterpapper och/eller olöslig testkemikalie. Analysen kan göras med gaskromatograf om kolanalysator inte finns att tillgå. Det är viktigt att flaskorna har testtemperatur eller nära testtemperatur när gasen i utrymmet ovanför vätskan analyseras. Metod b kan vara enklare för laboratorier som använder kolanalysatorer för att mäta oorganiskt kol. Det är viktigt att natriumhydroxidlösningen (punkt 21) som används för att omvandla CO₂ till karbonat är antingen nyberedd eller att lösningens halt av oorganiskt kol är känd, så att detta kan beaktas vid beräkning av testresultaten (se punkt 66 b).

Metod a: försurning till pH < 3

52. Före varje analysats ska analysatorn av oorganiskt kol kalibreras med hjälp av en lämplig standard (t.ex. 1 % w/w CO₂ i N₂). Koncentrerad ortofosforsyra (punkt 20) injiceras genom varje provtagningsflaskas gummipropp för att sänka mediets pH till < 3 (tillsatt t.ex. 1 ml till 107 ml testmedium). Flaskorna sätts tillbaka på skakbordet. Efter en timme på skakbordet i testtemperatur avlägsnas flaskorna, alikvoter (t.ex. 1 ml) av gas dras ur utrymmet ovanför vätskan i varje flaska och injiceras i analysatorn för oorganiskt kol. De uppmätta koncentrationerna oorganiskt kol registreras som mg C/l.
53. Principen med denna metod är att efter försurning till pH < 3 och stabilisering vid 20 °C, få en jämviktskonstant för fördelningen av CO₂ mellan vätske- och gasfaserna i testflaskorna som är 1,0 när den uppmäts som en koncentration (13). Detta bör demonstreras för testsystemet minst en gång, enligt följande:

Lägg upp flaskor som innehåller 5 och 10 mg/l oorganiskt kol med användning av vattenfritt natriumkarbonat (Na₂CO₃) i CO₂-fritt vatten som beretts genom försurning av vatten till pH 6,5 med koncentrerad ortofosforsyra (punkt 20), med sparging över natten med CO₂-fri luft och därefter höjning av pH till neutralt med alkali. Se till att kvoten mellan utrymmet ovanför vätskan och vätskans volym är samma som vid testningen (t.ex. 1:2). Försura och stabilisera till jämvikt enligt beskrivningen i punkt 52 och mät koncentrationerna av oorganiskt kol i både gas- och vätskefasen. Kontrollera att båda koncentrationerna är desamma inom gränserna för försöksfel. Om de inte är det, bör förfarandena ses över. Denna kontroll av fördelningen av oorganiskt kol mellan vätske- och gasfasen behöver inte göras varje gång testet utförs, men kan rutinmässigt göras när kalibrering utförs.

54. Om DOC-eliminering ska mätas (endast vattenlösliga testkemikalier) bör proverna tas från vätskefasen i separata (icke-försurade) flaskor, membranfiltreras och injiceras i DOC-analysatorn. Dessa flaskor kan enligt behov användas för andra analyser för mätning av primär bionedbrytning.

Metod b: omvandling av CO₂ till karbonat

55. Före varje analysats ska analysatorn för oorganiskt kol kalibreras med hjälp av lämplig standard, t.ex. en lösning av natriumbikarbonat (NaHCO₃) i CO₂-fritt vatten (se punkt 53) inom området 0–20 mg/l räknat som oorganiskt kol. Natriumhydroxidlösning (7 M, punkt 21) (t.ex. 1 ml till 107 ml medium) injiceras genom varje provtagningsflaskas gummipropp och flaskorna skakas i en timme vid testtemperaturen. Använd samma NaOH-lösning för alla flaskor som tas till provtagning på en viss dag, men inte nödvändigtvis för alla provtagningar under hela testets gång. Om absoluta bakgrundsvärden för oorganiskt kol krävs vid alla provtagningar, måste bestämning av oorganiskt kol göras för NaOH-lösningen varje gång den används. Flaskorna tas ur skakbordet och innehållet får sätta sig. Lämpliga volymer (t.ex. 50–1 000 µl) av vätskefasen i varje kärl dras ut med injektionsspruta. Proverna injiceras i analysatorn för oorganiskt kol och koncentrationerna registreras. Man bör se till att analysatorn är tillbörligt utrustad för att tåla de alkaliska prover som analyseras i denna metod.
56. Principen med metoden är att efter tillsättning av alkali och omskakning, ska koncentrationen av oorganiskt kol i utrymmet ovanför vätskan vara negligerbar. Detta bör kontrolleras för testsystemet minst en gång med användning av standarder för oorganiskt kol, tillsatt av alkali, jämviktsstabilisering och mätning av koncentrationen oorganiskt kol både i gas- och vätskefasen (se punkt 53). Koncentrationen i gasfasen bör närma sig noll. Denna kontroll av virtuell fullständig absorption av CO₂ behöver inte göras varje gång testet utförs.
57. Om DOC-eliminering ska mätas (endast vattenlösliga testkemikalier) bör proverna tas från vätskefasen i separata flaskor (som inte innehåller tillsatt alkali), membranfiltreras och injiceras i DOC-analysatorn. Dessa flaskor kan enligt behov användas för andra analyser för mätning av primär bionedbrytning.

DATA OCH RAPPORTERING

Beräkning av resultaten

58. Utifrån ett antagande om 100 % mineralisering av testkemikalie till CO₂, motsvarar det ThIC utöver det som produceras i kontrollkärlen för bakgrundsvärde det TOC som tillfördes till varje testkärl i testets början, vilket betyder att

$$\text{ThIC} = \text{TOC}$$

Totalmassan (mg) oorganiskt kol (TIC) i varje flaska är då

$$\text{TIC} = (\text{mg C i vätskan} + \text{mg C i gasfasen}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad \text{Ekvation 1}$$

där:

V_L = volymen vätska i flaskan (liter),

C_L = koncentrationen oorganiskt kol i vätskan (mg/l räknat som kol),

V_H = gasfasens volym (liter),

C_H = koncentrationen oorganiskt kol i gasfasen (mg/l räknat som kol).

Beräkningarna av totalt oorganiskt kol för de två analysmetoderna som används för mätning av oorganiskt kol i detta test beskrivs nedan i punkterna 60 och 61. Den procentuella bionedbrytningen (% D) i vart och ett fall fås genom följande:

$$\%D = \frac{(\text{TIC}_t - \text{TIC}_b)}{\text{TOC}} \times 100 \quad \text{Ekvation 2}$$

där:

TIC_t = mg TIC i testflaskan vid tidpunkten t ,

TIC_b = genomsnitt för mg TIC i kontrollflaskorna för bakgrundsvärde vid tidpunkten t ,

TOC = mg TOC som i början tillfördes testkärlet.

Den procentuella andelen biologisk nedbrytning % D beräknas för flaskorna för test (F_T), referens (F_C) och, om inhibitionsövervakning görs, övervakning (F_I) utifrån de respektive mängder TIC som producerats fram till varje provtagningstidpunkt.

59. Om det har förekommit en betydande ökning av TIC i de sterila kontrollerna (F_S) över testperioden, kan man sannolikt sluta sig till att det har förekommit abiotisk nedbrytning av testkemikalien, och detta måste beaktas vid beräkning av D i ekvation 2.

Försurning till pH < 3

60. Eftersom försurning till pH < 3 och balansering till jämvikt leder till utjämning av TIC-koncentrationen i vätske- och gasfaserna, behöver endast IC-koncentrationen i gasfasen mätas. Från ekvation 1 fås således $\text{TIC} = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, där V_B = serumflaskans volym.

Omvandling av CO₂ till karbonat

61. I denna metod görs beräkningarna såsom i ekvation 1, men den negligerbara mängden IC i gasfasen ignoreras, dvs. $V_H \times C_H = 0$ och $TIC = V_L \times C_L$.

Presentation av resultaten

62. En bionedbrytningskurva fås genom att plotta den procentuella biologiska nedbrytningen D mot inkubationstiden och, om möjligt, lagfasen, bionedbrytningsfasen, tiodagarsfönstret och platåfasen (den fas då maximal nedbrytning har uppnåtts och bionedbrytningskurvan fasar ut). Om det finns jämförbara resultat för parallella testkärn F_T (< 20 % skillnad), plottas en genomsnittskurva (se figur 1 i tillägg 2), och om inte, plottas kurvor för varje kärn. Genomsnittsvärdet för den procentuella bionedbrytningen i platåfasen bestäms eller det högsta värdet uppskattas (t.ex. när kurvan går nedåt i platåfasen), men i det senare fallet bör man se upp att det inte handlar om ett utomliggande värde. Ange i testrapporten den maximala nivån av biologisk nedbrytning såsom testkemikalien grad av bionedbrytning. Om antalet testkärn inte varit tillräckligt för att platåfasen ska framgå, används uppmätta data under testets sista dag för att beräkna ett medelvärde. Detta sista värde, medelvärdet av fem replikat, indikerar den precision med vilken den procentuella biologiska nedbrytningen bestämts. Rapportera också det värde som erhöles i slutet av tiodagarsfönstret.
63. Plotta på samma sätt en kurva för referenskemikalien F_C och, i förekommande fall, för den abiotiska elimineringskontrollen F_S och inhiberingskontrollen F_I.
64. Mängderna TIC i kontrollkärnen (F_B) registreras, liksom mängderna i flaskorna F_S (abiotisk kontroll), om dessa kärn har ingått i testet.
65. Beräkna D för F_T-kärnen, på grundval av teoretiskt IC-värde uppskattat endast från blandningens referenskomponent. Om på dag 28 $[(D_{FC}^{(1)} - D_{FI}^{(2)})/D_{FC}] \times 100 > 25 \%$, kan man anta att testkemikalien har inhiberat inokulatets aktivitet och detta kan vara orsaken till lägre värden på D_{FT} som erhållits under testbetingelserna. Då måste testet upprepas med en lägre testkoncentration och helst även med mindre DIC i inokulatet och TIC som bildas i kontrollkärnen, eftersom den lägre koncentrationen annars minskar metodens precision. Alternativt kan ett annat inokulat användas. Om det i flaskorna F_S (abiotiska) observeras en betydande ökning (> 10 %) av mängden TIC, kan abiotiska nedbrytningsprocesser ha inträffat.

Resultatens giltighet

66. Ett test anses vara giltigt om
- den genomsnittliga procentuella nedbrytningen i F_C-kärn (som innehåller referenskemikalie) är > 60 % senast den 14:e dagen efter inkubation, och
 - den genomsnittliga mängden TIC i kontrollkärnen F_B i slutet av testet är > 3 mg C/l.

Om dessa gränsvärden inte nås, måste testet upprepas med inokulat från en annan källa och/eller testförfarandena bör ses över. Om t.ex. en hög produktion av IC i kontrollkärnen är ett problem, bör förfarandet enligt punkterna 27–32 användas.

67. Om testkemikalien inte når upp till 60 % ThIC och inte visat sig vara inhiberande (punkt 65) kan testet upprepas med ökad koncentration av inokulat (upp till 30 mg/l) aktiverat slam och 100 ml utflöde/l) eller inokulat från andra källor, särskilt om nedbrytningen har legat inom området 20–60 %.

Tolkning av resultaten

68. Biologisk nedbrytning > 60 % inom tiodagarsfönstret demonstrerar i detta test att testkemikalien är biologiskt lättnedbrytbar i aeroba betingelser.
69. Om gränsvärdet på 60 % ThIC inte uppnås, bestäm pH-värdet i mediet i flaskor som inte har försurats eller alkaliserats – ett värde lägre än 6,5 kan tyda på att nitrifikation har inträffat. Upprepa i så fall testet med en buffertlösning med högre koncentration.

⁽¹⁾ Procentuell nedbrytning i F_C-kärn (som innehåller referensämne).

⁽²⁾ Procentuell nedbrytning i F_I-kärn.

Testrapport

70. Sammanställ en tabell med % D för varje flaska med testkemikalie (F_T), referenskemikalie (F_C) och, i förekommande fall, inhibitions kontroll (F_I) för varje provtagningsdag. Om jämförbara resultat erhålls för replikatflaskor, plotta en kurva med genomsnittet av % D mot tiden. Registrera mängden TIC i kontrollerna (F_B) och i de sterila kontrollerna (F_S) DOC och/eller andra determinanter och den procentuella elimineringen.
71. Bestäm genomsnittsvärdet för % D för plåtåfasen eller använd det högsta värdet om bionedbrytningskurvan går nedåt i plåtåfasen, och rapportera detta som graden bionedbrytning för testkemikalien. Det är viktigt att se till att i det senare fallet se till att det högsta värdet inte är ett utanför liggande värde.
72. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

- Trivialnamn, kemisk beteckning, CAS-nummer, strukturformel och relevanta fysikalkemiska egenskaper.
- Testkemikalien renhet (orenheter).

Testbetingelser:

- Hänvisning till denna testmetod.
- Beskrivning av testsystemet (t.ex. kärvolym, kvoten mellan volymen gasfas och volymen vätskefas, omrörningsmetod osv.).
- Applicering av testkemikalie och referenskemikalie till testsystemet, testkoncentration och mängd kol som doserats till var och en testflaska, eventuell användning av lösningsmedel.
- Uppgifter om inokulat, eventuell förbehandling och förkonditionering.
- Inkubationstemperatur.
- Validering av IC-analysens princip.
- Huvudegenskaper för IC-analysatorn (och alla andra analysmetoder som använts).
- Antalet replikat.

Resultat:

- Rådata och beräknade värden för biologisk nedbrytning i tabellform.
- Kurva över procentuell nedbrytning av test- och referenskemikalierna mot tiden, lagfas, nedbrytningsfas, tiodagarsfönster och lutning.
- Procentandelen eliminering vid plåtåfasen, vid testets slut och efter tiodagarsfönstret.
- Motiveringar för eventuella förkastade testresultat
- Övriga fakta som är relevanta för de förfaranden som har använts.
- Diskussion om resultaten.

LITTERATUR

- (1) Kapitel C.4 i denna bilaga, Bestämning av "lätt" bionedbrytbarhet – CO₂-utveckling (metod C.4-C).
- (2) Sturm R. N. (1973), "Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation", *J.A., Oil Chem Soc.* 50, s. 159–167.
- (3) Larson R. J. (1979), "Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals", *Appl. Env. Microbiol.* 38, s. 1153–1161.
- (4) Larson R. J., Hansmann M. A. och Bookland E. A. (1996), "Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants", *Chemosphere* 33, s. 1195–1210.
- (5) ISO 9439 (1990; reviderad 1999), *Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium - Carbon dioxide evolution Test (Sturm)*.
- (6) US EPA (1996), "Fate, Transport and Transformation Test Guideline", 835, "3110 Carbon dioxide evolution test", Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC.
- (7) US EPA (1996), "Fate, Transport and Transformation Test Guideline", 835, 3100, "Aerobic aquatic biodegradation", Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC.
- (8) Gledhill W. E., (1975), "Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate", *Appl. Microbiol.* 30, s. 922–929.
- (9) Weytjens D., Van Ginneken I. och Painter H. A. (1994), "The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability", *Chemosphere* 28, s. 801–812.
- (10) Ennis D. M. och Kramer A. (1975), "A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides", *J. Food Sci.* 40, s. 181–185.
- (11) Ennis D. M., Kramer A., Jameson C. W., Mazzoccki P. H. och Bailey P. H. (1978), *Appl. Env. Microbiol.* 35, s. 51–53.
- (12) Boatman R. J., Cunningham S. L. och Ziegler D. A. (1986), "A method for measuring the biodegradation of organic chemicals", *Env. Toxicol. Chem.* 5, s. 233–243.
- (13) Struijs J. och Stoltenkamp J. (1990), "Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test", *Ecotox. Env. Safety* 19, s. 204–211.
- (14) Birch R. R. och Fletcher R. J. (1991), "The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability", *Chemosphere* 23, s. 507–524.
- (15) Birch R. R., Biver C., Campagna R., Gledhill W. E., Pagga U., Steber J., Reust H. och Bontinck W. J. (1989), "Screening of chemicals for anaerobic biodegradation", *Chemosphere* 19, s. 1527–1550.
- (16) ISO 14593, (1999), *Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels (CO₂ headspace test)*.
- (17) Battersby N. S. (1997), "The ISO headspace CO₂ biodegradation test", *Chemosphere* 34: s. 1813–1822.
- (18) US EPA (1996), "Fate, Transport and Transportation", Series 835, 3120, "Sealed vessel carbon dioxide production test", Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.
- (19) Battersby N. S., Ciccognani D., Evans M. R., King D., Painter H.A., Peterson D. R. och Starkey M. (1999), "An "inherent" biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test", *Chemosphere* 38, s. 3219–3235.

-
- (20) Kapitel C.4 i denna bilaga, Bestämning av "lätt" bionedbrytbarhet.
- (21) OECD, 1988, "OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI)", Paris.
- (22) Kapitel C.11 i denna bilaga, Biologisk nedbrytbarhet – Aktiverat slam – Respirationshämningstest.
- (23) Struijs J., Stoltenkamp-Wouterse M. J. och Dekkers A. L. M. (1995), "A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests", *Biodegradation* 6, s. 319–327.
- (24) EU (1999), "Ring-test of the ISO Headspace CO₂ method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697", Water Research Centre, maj 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.
- (25) ISO 10634 (1996) *Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.*
-

Tillägg 1

FÖRKORTNINGAR OCH DEFINITIONER

IC: oorganiskt kol.

ThCO₂: teoretisk koldioxid (mg) är den mängd koldioxid som enligt beräkningar produceras från känd eller beräknad kolhalt i testkemikalien vid fullständig mineralisering, också uttryckt som mg koldioxid som utvecklas per mg testkemikalie.

DOC: upplöst organiskt kol är den mängd organiskt kol som finns i lösningen eller som passerar ett 0,45-mikrometers filter eller som blir kvar i centrifugatet efter centrifugering vid cirka 4 000 g (cirka 40 000 m s⁻²) i 15 minuter.

DIC: upplöst oorganiskt kol.

ThIC: teoretiskt oorganiskt kol.

TIC: totalt oorganiskt kol.

lätt bionedbrytbar: en godtycklig klass kemikalier som har klarat vissa specifika screeningtester för fullständig bionedbrytning; dessa tester är så krävande att man antar att kemikalierna snabbt bryts ned fullständigt i vattenmiljö i aeroba betingelser.

tiodagarsfönster: de 10 dagar som följer omedelbart efter att 10 % biologisk nedbrytning har uppnåtts.

lätt biologisk nedbrytbarhet: en klassificering för en kemikalie för vilken det finns otvetydiga belägg för biologisk nedbrytbarhet (primär eller fullständig) i alla tester för biologisk nedbrytbarhet.

fullständig aerob biologisk nedbrytning: den nivå av nedbrytning som nås när testkemikalien har förbrukats totalt av mikroorganismer under utveckling av koldioxid, vatten, mineralsalter och nya mikrobiella celler (biomassa).

mineralisering: mineralisering är en fullständig nedbrytning av en organisk kemikalie till CO₂ och H₂O i aeroba förhållanden, och till CH₄, CO₂ och H₂O i anaeroba förhållanden.

lagfas: tiden från teststart fram till acklimatisering och/eller anpassning av de nedbrytande mikroorganismerna och när nivån för biologisk nedbrytning av en testkemikalie eller organiskt material har nått upp till en detekterbar nivå (t.ex. 10 % teoretisk biologisk nedbrytning, eller lägre, beroende på mätningsteknikens precision).

nedbrytningsfas: tiden från lagfasens slut fram till den tidpunkt då 90 % av maximinivån för nedbrytning har nåtts.

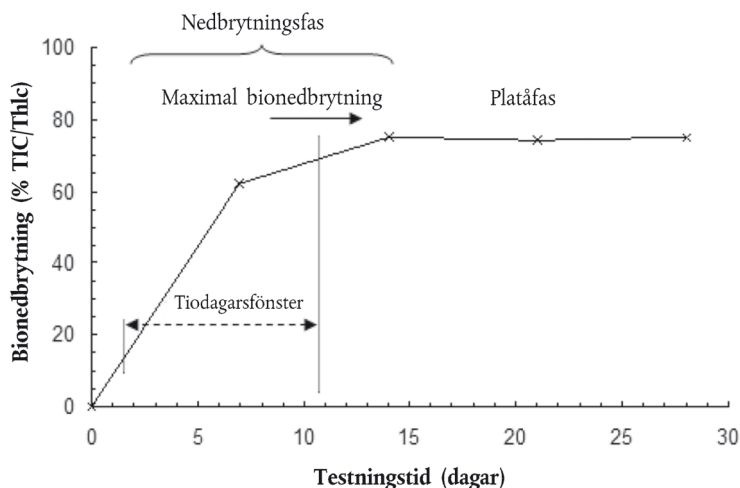
platåfas: platåfasen inträffar när maximal nedbrytning har uppnåtts och bionedbrytningskurvan fasar ut.

testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

Tillägg 2

Exempel på en bionedbrytningskurva

Figur 1

Biologisk nedbrytning av 1-oktanol i CO₂ Headspace-test

Ordlista:

Bionedbrytning

Nedbrytningsfas

Maximal bionedbrytning

Platåfas

Tiodagarsfönster

Testningstid (dagar)

C.30 BIOACKUMULERING I JORDLEVANDE OLIGOCHAETER (FÅBORSTMASKAR)

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje 317 (2010). Bland testmetoderna rörande omvandling, spridning och nedbrytning i miljön publicerades Biokoncentration: Genomflödestest med fisk (kapitel C.13 i denna bilaga (49)) och bioackumulering i sedimentlevande bottenlevande oligochaeter (53) 1996 respektive 2008. Att extrapolera data om bioackumulering i vattenlevande organismer till jordlevande organismer såsom dagmaskar är svårt eller omöjligt. Modellberäkningar baserade på en testkemikalies lipofilitet, t.ex. (14) (37), används för närvarande för bedömning av bioackumulering av kemikalier i jord, såsom t.ex. i EU:s tekniska vägledningsdokument (19). Behovet av en miljöspecifik testmetod har redan tagits upp, t.ex. (55). En sådan metod är särskilt viktig för utvärdering av sekundär förgiftning i livsmedelskedjan för jordlevande organismer (4). Det finns flera nationella testmetoder som behandlar bioackumulering i andra organismer än fisk, t.ex. (2) och (72). En metod för mätning av bioackumulering från förorenade jordar i dagmaskar (*Eisenia fetida*, Savigny) och ringmaskar har utvecklats av American Society for Testing and Materials (3). Genom en internationellt accepterad metod för bestämning av bioackumulering i spikad jord förbättras riskbedömningen av kemikalier i ekosystem i jordar, t.ex. (25) (29).
2. Jordätande invertebrater utsätts för jordbundna kemikalier. Bland dessa spelar jordlevande oligochaeter (fåborstmaskar) en viktig roll för jordarnas struktur och funktion (15) (20). Jordlevande oligochaeter lever i jorden och delvis på jordytan (särskilt i förnaskiktet) och de representerar ofta de vanligaste arterna i termer av biomassa (54). Genom att dessa sköter bioturbation av jorden och även utgör byte kan de ha en stark inverkan på kemikaliers biotillgänglighet för andra organismer såsom invertebrater (t.ex. jagande kvalster och skalbaggar, t.ex. (64)) eller jagande ryggradsdjur (t.ex. råvar och måsar) (18) (62). Vissa arter av jordlevande oligochaeter som för närvarande används för ekotoxikologisk testning beskrivs i tillägg 5.

3. I ASTM:s Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid Potworm *Enchytraeus albidus* (3) finns många väsentliga och användbara uppgifter för hur man kan genomföra denna testmetod för bioackumulering. Övriga dokument som det hänvisas till inom den här testmetoden är kapitel C.13 i denna bilaga, Biokoncentration: Genomflödes-test med fisk (49) och OECD:s testriktlinje 315: bioackumulering i sedimentlevande bottenlevande oligochaeter (53). Testmetoden bygger också i hög grad på praktisk erfarenhet från studier om bioackumulering i jordar och publicerad litteratur, t.ex. (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79).
4. Testmetoden lämpar sig bäst för stabila, neutrala organiska kemikalier som tenderar att adsorberas till jordar. Testning av bioackumulering av stabila metallorganiska föreningar som binds till jord kan göras med denna testmetod. Testet kan också användas för metaller och andra spårelement.

FÖRUTSÄTTNINGAR

5. Tester för mätning av bioackumulering av en kemikalie i jordlevande oligochaeter har gjorts med tungmetaller (se t.ex. (63)) och långlivade organiska kemikalier med log K_{ow} -värden mellan 3,0 och 6,0, t.ex. (40). Sådana tester kan också användas för
 - kemikalier som har log K_{ow} på 6,0 eller högre (superhydrofoba kemikalier),
 - kemikalier som tillhör en klass av organiska kemikalier som är kända för att ha potential att bioackumuleras i levande organismer, t.ex. ytaktiva eller mycket adsorptiva kemikalier,
 - kemikalier vars strukturella egenskaper indikerar potential för bioackumulering, t.ex. analoger till kemikalier med känd bioackumuleringspotential,
 - metaller.
6. Information om testkemikalien, såsom trivialnamn, kemiskt namn (helst enligt IUPAC), strukturformel, CAS-nummer, renhet, säkerhetsåtgärder, lämpliga lagringsförhållanden och analysmetoder bör inhämtas innan studien inleds. Därutöver bör det finnas information om
 - a) vattenlöslighet,
 - b) fördelningskoefficient oktanol-vatten, K_{ow} ,
 - c) fördelningskoefficient jord-vatten, K_{oc} ,
 - d) ångtryck,
 - e) nedbrytbarhet (t.ex. i jord, vatten),
 - f) kända metaboliter.
7. Radioaktivmärkta eller inte radioaktivmärkta testkemikalier kan användas. För att underlätta analysen rekommenderas dock radioaktivmärkta testkemikalier. Beslutet bör baseras på detektionsgränser eller krav på att mäta ursprunglig kemikalie och metaboliter. Om en radioaktivmärkt testkemikalie används och totala radioaktiva rester mäts, är det viktigt att de radioaktivmärkta resterna både i jorden och i testorganismerna analyseras för procentandelen av ursprunglig testkemikalie och radioaktivmärkta metaboliter, t.ex. i prover som tas i stabilt tillstånd eller i slutet av upptagningsfasen, för att göra det möjligt att beräkna bioackumuleringsfaktor (BAF) för den ursprungliga testkemikalien och berörda metaboliter i jorden (se punkt 50). Den metod som beskrivs här måste eventuellt modifieras, t.ex. för att ge tillräcklig biomassa för mätning av organiska testkemikalier som inte är radioaktivmärkta eller metaller. När totalmängden radioaktiva rester har uppmätts (genom vätskescintillationsräkning efter extraktion, förbränning eller vävnadsupplösning), baserar sig bioackumuleringsfaktorn på den ursprungliga kemikalien och metaboliterna. Beräkningen av bioackumuleringsfaktorn bör helst baseras på den ursprungliga testkemikalien och totalmängden radioaktiva rester. Ackumuleringsfaktorn biota-jord (BSAF), normaliserad till maskens fettinnehåll och jordens halt organiskt kol (OC) ska alltså beräknas utifrån BAF, med tanke på jämförbarhet mellan resultat från olika bioackumuleringsstest.

8. Testkemikalien toxicitet för de arter som används i testet bör vara känd, t.ex. en effektkoncentration (EC_{50}) eller en dödlig koncentration (LC_{50}) vid tidpunkten för upptagningsfasen, t.ex. (19). Den valda koncentrationen för testkemikalien bör helst vara 1 % av akut asymptotiskt LC_{50} och bör vara minst tiofaldig jämfört med detektionsgränsen i jord med den analysmetod som används. Helst bör toxicitetsvärden, om sådana finns, från långvariga studier om subletala endpoints användas (51) (52). Om sådana uppgifter inte finns kan test om akut toxicitet ge värdefull information (se t.ex. (23)).
9. Det bör finnas en lämplig analysmetod med känd exakthet, precision och känslighet för kvantifiering av kemikalien i testlösningarna, i jorden och i det biologiska materialet, tillsammans med uppgifter om beredning och lagring av såväl prover som säkerhetsdatablad. De analytiska detektionsgränserna för testkemikalien i jord och maskvävnad bör också vara kända. Om en ^{14}C -märkt testkemikalie används, bör den specifika radioaktiviteten ($Bq\ mol^{-1}$) och den procentuella andelen radioaktivitet associerad med orenheter vara kända. Testkemikalien specifika radioaktivitet bör vara tillräckligt hög för att möjliggöra analys, och de testkoncentrationer som används får inte framkalla toxiska effekter.
10. Testet kan genomföras med syntetiska eller naturliga jordar. Information om egenskaper hos naturlig jord som används, t.ex. ursprung eller beståndsdelar, pH, halten organiskt kol, partikelstorleksfördelning (procentandel sand, dy och lera) och vattenhållningskapacitet (WHC), bör vara känd innan testet inleds (3) (48).

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

11. Till de parametrar som karakteriserar en testkemikalies bioackumulering hör bioackumuleringsfaktorn (BAF), upptagningskonstanten (k_u) och elimineringskonstanten (k_e). Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.
12. Testet består av två faser: upptagningsfasen (exponering) och elimineringsfasen (efter exponering). Under upptagningsfasen exponeras replikerade grupper av maskar för jord som har spikats med testkemikalien. I tillägg till testdjuren hålls kontrollgrupper av maskar under identiska förhållanden utan testkemikalie. Testorganismernas torrsvikt och fettinnehåll mäts. Detta kan göras med maskarna i kontrollgruppen. Analytiska bakgrundsvärden kan fås genom att analysera prover av kontrollmaskarna och kontrolljorden. För elimineringsfasen flyttas maskarna till en jord som inte innehåller testkemikalie. En elimineringsfas krävs alltid, med undantag för om upptaget av testkemikalie under exponeringen har varit obetydligt. Elimineringsfasen ger information om den hastighet med vilken testkemikalien utsöndras av testorganismerna (se t.ex. (27)). Om stabilt tillstånd inte uppnås under upptagningsfasen bör bestämningen av de kinetiska parametrarna – kinetisk bioackumuleringsfaktor BAF_k , upptagnings- och elimineringskonstanterna – helst baseras på simultan anpassning av resultaten från upptagnings- och elimineringsfaserna. Koncentrationen av testkemikalie i/på maskarna kontrolleras under testets båda faser.
13. Under upptagningsfasen görs mätningar vid provtagningstidpunkterna upp till 14 dagar (enchytraeider) eller 21 dagar (daggmaskar) tills stabilt tillstånd uppnås (11) (12) (67). Stabilt tillstånd uppnås när en kurva som plottas för koncentrationen i maskarna mot tiden blir parallell med tidsaxeln, och tre på varandra följande koncentrationsanalyser på prover som tas med minst två dagars mellanrum inte varierar med mer än $\pm 20\%$ sinsemellan baserat på statistiska jämförelser (t.ex. variansanalys, regressionsanalys).
14. För elimineringsfasen överförs testorganismerna till kärl som innehåller samma substrat men ingen testkemikalie. Under elimineringsfasen görs mätningar vid provtagningstidpunkterna under 14 dagar (enchytraeider) eller 21 dagar (daggmaskar), utom om tidigare analytisk bestämning visar en minskning på 90 % av testkemikalierester i maskarna. Koncentrationen av testkemikalie i maskarna i slutet av elimineringsfasen rapporteras som icke-eliminerade rester. Bioackumuleringsfaktorn vid stabilt tillstånd (BAF_{ss}) beräknas helst både som kvoten mellan koncentrationen i maskarna (C_a) och i jorden (C_s) vid uppenbart klart fastställt stabilt tillstånd, och som en kinetisk bioackumuleringsfaktor (BAF_k) som kvoten mellan upptagningsfaktorn (k_u) och elimineringskonstanten (k_e) (för definitioner, se tillägg 1) utifrån ett antagande om första ordningens kinetik (för beräkningar, se tillägg 2). Om första ordningens kinetik uppenbart inte kan tillämpas, bör andra modeller användas.
15. Upptagningskonstanten, elimineringskonstanten (eller konstanterna, om andra modeller ingår), den kinetiska bioackumuleringsfaktorn (BAF_k) och, där det är möjligt, konfidensgränserna för var och en av dessa parametrar beräknas utifrån datoriserade modellekvationer (se vägledning i tillägg 2). Anpassningens kvalitet (Goodness of fit) för valfri modell kan göras t.ex. utifrån korrelationskoefficienten eller determinationskoefficienten (koefficienter nära ett tyder på god kvalitet) eller testas med chi-två-test. Även värdet på medelfelet eller konfidensgränsen kring de uppskattade parametrarna kan ge indikation på anpassningens kvalitet för modellen.
16. För att minska testresultatens variation för testkemikalier med hög lipofilitet bör bioackumuleringsfaktorerna uttryckas i förhållande till fettinnehållet och halten organiskt kol (kg organiskt kol i jorden per kg fett i mask). Denna princip är baserad på att det för vissa kemiska klasser finns ett klart samband mellan potentialen för bioackumulering och lipofilitet, vilket har klart etablerats för fisk (47). Det finns ett förhållande mellan

fettinnehållet i fisk och bioackumulering av sådana kemikalier. För bottenlevande (bentiska) organismer har man funnit liknande korrelationer (se t.ex. (30) (44)). Denna korrelation har även påvisats för jordlevande oligochaeter (se t.ex. (5), (6), (7) (14)). Om tillräcklig mängd maskvävnad finns att tillgå, kan testdjurens fettinnehåll bestämmas på samma biologiska material som används för bestämning av koncentrationen testkemikalie. Alternativt kan kontrolldjur användas för mätning av fettinnehållet.

TESTETS GILTIGHET

17. För att ett test ska vara giltigt måste följande kriterier uppfyllas för både kontroll- och behandlingsgrupperna:

- Vid slutet av testet får den totala dödligheten under upptagnings- och elimineringsfaserna inte överskrida 10 % (daggmaskar) eller 20 % (enchytraeider) av det totala antalet tillförda maskar.
- För *Eisenia fetida* och *Eisenia andrei* får medelförlusten uppmätt vid slutet av upptagningsfasen och vid slutet av elimineringsfasen inte överskrida 20 % jämfört med den ursprungliga färskvikten vid start av varje fas.

METODBESKRIVNING

Testarter

18. Det finns flera arter av jordlevande oligochaeter som rekommenderas för testning av bioackumulering. De oftast använda arterna *Eisenia fetida*, *Eisenia andrei* (Lumbricidae), *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* eller *Enchytraeus luxuriosus* (Enchytraeidae) beskrivs i tillägg 5.

Apparatur

19. Uppmärksamhet bör fästas vid att undvika användning av material (gäller alla delar av utrustningen) som kan upplösas, adsorbära testkemikalien eller läcka andra kemikalier och som kan ha negativa effekter på testdjuren. Standardmässiga rektangulära eller cylindriska kärl gjorda av kemiskt inert material kan användas, av lämplig storlek för antalet testmaskar. Rostfritt stål, plast eller glas kan användas för utrustning som är i kontakt med testmediet. Testkärlen ska vara tillbörligen täckta så att maskarna inte kan komma ut, samtidigt som tillräcklig lufttillförsel säkerställs. För kemikalier med höga adsorptionskoefficienter, såsom syntetiska pyretroider, kan det vara nödvändigt med silaniserat glas. I sådana situationer måste utrustningen kasseras efter användning (49). Det är viktigt att se till att radioaktivmärkta testämnen och flyktiga kemikalier inte kan läcka ut. Det bör finnas fallor (t.ex. gastvättflaskor av glas) som innehåller lämpliga adsorbenter som håller kvar eventuella rester som avdunstar från testkärlen.

Jord

20. Testjorden bör ha en kvalitet som ger testorganismerna möjlighet att överleva och helst föröka sig under aklimatiserings- och testperioderna utan avvikelser från normalt utseende och beteende. Maskarna bör vara inne i jorden.
21. Den syntetiska jord som beskrivs i kapitel C.8 i denna bilaga (48) rekommenderas som substrat för testningarna. Beredning av syntetisk jord för användning i bioackumuleringstest och rekommendationer för hur denna jord ska lagras beskrivs i tillägg 4. Lufttorkad syntetisk jord kan förvaras i rumstemperatur fram till användningen.
22. Även naturliga jordar från oförorenade platser kan användas som test- och/eller odlingsjord. För naturjordar bör minst anges ursprung (insamlingsplats), pH, halten organiskt kol, partikelstorleksfördelning (procentandel sand, dy och lera), maximal vattenhållningskapacitet (WHC_{max}) och procentuell andel vatten (3). Analys av jorden eller dess beståndsdelar med avseende på mikroföroreningar bör ge användbar information. Om fältjord från odlingsmark används, får den inte ha behandlats med växtskyddsprodukter eller gödsel från behandlade djur under minst ett år eller med organiska gödselmedel under minst sex månader innan jordprovet tas (50). De förfaranden som används för hantering av naturjordar innan dessa jordar används i ekotoxikologiska test med oligochaeter i laboratoriet beskrivs i (3). För naturjordar bör förvaringstiden i laboratoriet minimeras.

Applicering av testkemikalien

23. Testkemikalien blandas in i jorden. Testkemikalien fysikalkemiska egenskaper bör beaktas. En vattenlöslig testkemikalie bör upplösas fullständigt i vatten innan den blandas med jorden. Det rekommenderade spikningsförfarandet för dåligt vattenlösliga kemikalier är att en eller flera beståndsdelar i (den syntetiska) jorden beläggs med testkemikalien. Till exempel kan kvartssand eller en del av den dränkas in med en lösning av testkemikalien i lämpligt organiskt lösningsmedel som får avdunsta långsamt tills det torkat bort. Därefter kan den

belagda jordfraktionen blandas i den våta jorden. En viktig fördel med detta förfarande är att inget lösningsmedel tillförs jorden. När naturjord används kan testkemikalien tillsättas genom att spika en lufttorkad del av jorden enligt det som beskrivs ovan för syntetisk jord, eller genom att blanda in testkemikalien i våt jord, med ett efterföljande avdunstningssteg om ett solubiliseringsmedel används. Allmänt taget bör man så långt som möjligt undvika kontakt mellan våt jord och lösningsmedel. Följande bör beaktas (3):

- Om annat lösningsmedel än vatten används, bör det vara blandningsbart med vatten och/eller kunna avlägsnas (t.ex. genom avdunstning) så att endast testkemikalien blir kvar i jorden.
 - Om lösningsmedelskontroll används behövs ingen negativ kontroll. Lösningsmedelskontrollen bör ha den högsta koncentrationen av lösningsmedel som tillförs jorden och lösningsmedlet bör härstamma från samma sats som används för beredning av stamlösningen. Lösningsmedlets toxicitet och flyktighet och testkemikaliens löslighet i det valda lösningsmedlet bör vara de huvudsakliga kriterierna vid valet av lämpligt solubiliseringsmedel.
24. För kemikalier med dålig löslighet i vatten och organiska lösningsmedel kan 2,0–2,5 g finmald kvartssand per testkäril blandas med mängden testkemikalie, t.ex. genom mortling, för att få önskad testkoncentration. Blandningen av kvartssand och testkemikalie tillförs den förhandsfuktade jorden och blandas omsorgsfullt med lämplig mängd avjoniserat vatten för att få önskad fukthalt. Den slutliga blandningen fördelas i testkärilen. Förfarandet upprepas för varje testkoncentration och likaså bereds en lämplig kontroll med 2,0–2,5 g finmald kvartssand per testkäril.
25. Koncentrationen av testkemikalie i jorden bör fastställas efter spikning. Innan testorganismerna tillförs jorden bör det kontrolleras att testkemikalien är homogent fördelad i jorden. Metoden för spikning och motivering för valet av ett visst spikningsförfarande bör rapporteras (24).
26. Jämvikten mellan jorden och porvattenfasen bör idealiskt sett etableras innan organismerna tillförs; en tidsperiod på fyra dagar vid 20 °C rekommenderas. För ett antal dåligt vattenlösliga organiska kemikalier kan tiden för att nå faktisk jämvikt mellan adsorberade och upplösta fraktioner räknas i dagar eller månader. Beroende på studiens ändamål, t.ex. om man vill efterlikna vissa miljöförhållanden, kan den spikade jorden få "äldras" för en längre period, t.ex. för metaller i tre veckor vid 20 °C (22).

Odling av testorganismer

27. Maskarna bör helst hållas i en permanent laboratorieodling. Vägledning om laboratorieodlingsmetoder för *Eisenia fetida* och *Eisenia andrei* och arter av enchytraeider finns i tillägg 5 (se också (48) (51) (52)).
28. Maskarna som används för testet bör vara fria från synliga sjukdomar, abnormaliteter och parasiter.

TESTFÖRFARANDE

29. Testorganismerna exponeras för testkemikalien under upptagningsfasen. Upptagningsfasen ska pågå i 14 dagar (enchytraeider) eller 21 dagar (dagmaskar) utom om det kan påvisas att stabilt stadium har uppnåtts.
30. För elimineringsfasen flyttas maskarna till en jord som inte innehåller testkemikalie. Den första provtagningen bör göras 4–24 timmar efter elimineringsfasens början. Exempel på provtagningsschema för en 21-dagars upptagningsfas och en 21-dagars elimineringsfas finns i tillägg 3.

Testorganismer

31. Många arter av jordlevande enchytraeider har en mycket låg individuell vikt (t.ex. 5–10 mg våtvikt per individ för *Enchytraeus albidus* och mindre för *Enchytraeus crypticus* eller *Enchytraeus luxuriosus*). För vägning och kemisk analys kan det vara nödvändigt att poola maskarna i replikattestkärilen (dvs. alla maskar i ett replikat för att få de analytiska vävnadsresultaten). Tjugo individer enchytraeider tillförs varje replikat, och antalet replikat bör vara minst tre. Om testkemikaliens analytiska detektionsgräns är hög kan det krävas flera maskar. För testarter med högre individuell vikt (*Eisenia fetida* och *Eisenia andrei*) kan replikatkäril med en enda individ användas.
32. Dagmaskar som används i ett test bör ha liknande vikt (t.ex. *Eisenia fetida* och *Eisenia andrei* bör ha en individuell vikt på 250–600 mg). Enchytraeider (t.ex. *Enchytraeus albidus*) bör ha en längd på cirka 1 cm. Alla maskar som används i ett visst test bör komma från samma källa och vara vuxna individer med clitellum (gördel) (se tillägg 5). Eftersom ett djurs vikt och ålder kan påverka BAF-värdena (t.ex. beroende på varierande

fettinnehåll och/eller förekomsten av ägg), bör dessa parametrar registreras noggrant och beaktas vid tolkningen av resultaten. Dessutom kan kokonger deponeras under exponeringsperioden, vilket också påverkar BAF-värdena. Det rekommenderas att ett delprov av testmaskarna vägs före testet för att få en uppskattning av våt och torr medelvikt.

33. Förhållandet mellan jord och maskar bör vara högt för att minimera sjunkande koncentration av testkemikalien i jorden under upptagningsfasen. För *Eisenia fetida* och *Eisenia andrei* bör det finnas en minimimängd på 50 g jord (torrvikt) per mask och för enchytraeider rekommenderas en minimimängd på 10–20 g jord (torrvikt) per testkärl. Jordlagret i kärlet bör vara 2–3 cm (enchytraeider) eller 4–5 cm (daggmaskar).
34. Testmaskarna tas bort ur odlingen (t.ex. enchytraeider med användning av guldsmedstång). Vuxna exemplar överförs till obehandlad testjord för akklimatisering och ges föda (se punkt 36). Om testbetingelserna avviker från odlingsbetingelserna bör en akklimatiseringsfas på 24–72 timmar vara tillräcklig för att maskarna ska anpassa sig till testbetingelserna. Efter akklimatiseringen sköljs maskarna genom att överförs till glaskärl (t.ex. petriskålar) som innehåller rent vatten, och därefter vägs maskarna innan de överförs till testjorden. Före vägningen ska överskottsvatten avlägsnas från maskarna genom att försiktigt stryka av dem längs skålens kant eller försiktigt torka av dem med en lätt fuktad pappersduk.
35. Testorganismernas nedgrävningsbeteende bör observeras och registreras. I test med daggmaskar gräver sig djuren (kontroll och behandling) in i jorden inom några timmar; detta bör kontrolleras senast 24 timmar efter att maskarna har placerats i testkärlet. Om maskarna inte gräver in sig i jorden (t.ex. över 10 % mer än hälften av maskarna i upptagningsfasen), tyder detta på att testbetingelserna är olämpliga eller att testorganismerna inte är friska. Då bör testet stoppas och göras på nytt. Enchytraeiderna vistas i huvudsak i jordens håligheter och det är vanligt att deras integument inte alltid kommer i kontakt med omgivande substrat; exponeringen av grävande och icke-grävande enchytraeider antas vara ekvivalent och om enchytraeiderna inte gräver in sig i jorden betyder detta inte nödvändigtvis att testet måste upprepas.

Utfodring

36. Utfodring rekommenderas om jorden har låg halt totalt organiskt kol. Om syntetisk jord används rekommenderas veckovis utfodring (dvs. maskarna får föda en gång i veckan) med 7 mg torr dynga per g torrvikt jord för daggmaskar och en veckovis mängd på 2–2,5 mg malda havreflingor per g torrvikt jord för enchytraeider (11). Den första portionen föda bör blandas med jorden omedelbart innan testorganismerna tillförs. Helst ska samma typ av föda som i odlingarna användas (tillägg 5).

Ljus och temperatur

37. Testningarna bör genomföras med en kontrollerad ljus/mörker-cykel på 16/8 timmar, helst med 400–800 lx i området där testkärlet finns (3). Testtemperaturen bör vara 20 ± 2 °C under hela testet.

Testkoncentrationer

38. En enda koncentration används. Om ytterligare koncentrationer används måste detta motiveras. Om testkemikalens toxicitet (EC_x) ligger nära den analytiska detektionsgränsen rekommenderas användning av radioaktivmärkt testkemikalie med hög specifik radioaktivitet. För metaller bör koncentrationen ligga över bakgrundsnivåerna i vävnad och jord.

Replikat

39. För kinetikmätningar (upptagnings- och elimineringsfaserna) bör det finnas minst tre behandlade replikatkärl per provtagningspunkt. Totalantalet replikat som bereds bör vara tillräckligt för att täcka alla provtagningspunkter under upptagnings- och elimineringsfaserna.
40. För biologiska observationer och mätningar (t.ex. förhållandet mellan torrvikt och våtvikt, fettinnehåll) samt för analys av bakgrundskoncentrationerna i maskar och jord, bör minst 12 replikatkärl med negativ kontroll (fyra provtagningar vid start, fyra vid slutet av upptagningen och fyra vid slutet av elimineringen) beredas om inget annat lösningsmedel än vatten används. Om solubiliseringsmedel används för applicering av testkemikalien bör det finnas en lösningsmedelskontroll (fyra replikatkärl för provtagningen vid start, fyra vid slutet av upptagningen och fyra vid slutet av elimineringen) som innehåller alla beståndsdelar utom testämnet och som körs i tillägg till de behandlade replikaten. I detta fall kan fyra ytterligare replikatkärl med negativ kontroll (inget lösningsmedel) även användas för frivillig provtagning i slutet av upptagningsfasen. Dessa replikat kan jämföras biologiskt med lösningsmedelskontrollen för att få information om eventuella effekter av lösningsmedlet på testorganismerna. Likaså rekommenderas ett tillräckligt antal ytterligare reservreplikatkärl (t.ex. åtta) för behandling och kontroll(er).

Frekvens för kvalitetsmätning av jord

41. Vid start och slut av upptagnings- och elimineringsfaserna bör jordens pH, fukthalt och temperatur mätas (kontinuerligt). En gång per vecka bör jordens fukthalt kontrolleras genom att väga testkärnen och jämföra de vikterna med vikterna vid testets början. Vattenförlust bör kompenseras genom tillförsel av avjoniserat vatten.

Provtagning och analys av maskar och jord

42. Exempel på ett schema för upptagnings- och eliminationsfaserna i bioackumuleringstest för dagmaskar och enchytraeider finns i tillägg 3.
43. Jordprover tas från testkärnen för bestämning av koncentrationen testkemikalie innan maskarna tillförs, samt under upptagnings- och elimineringsfaserna. Under testet bestäms koncentrationerna testkemikalie i maskarna och jorden. I regel mäts de totala koncentrationerna i jorden. Alternativt kan koncentrationerna i porvatten mätas, och då bör motivering och lämpliga metoder fastställas innan studien inleds, och inkluderas i rapporten.
44. Prover av maskar och jord tas minst sex gånger under upptagnings- och elimineringsfaserna. Om man kan påvisa att testkemikalien är stabil, kan antalet jordanalyser reduceras. Det rekommenderas att minst tre replikat analyseras i början och slutet av upptagningsfasen. Om koncentrationen i jord uppmätt i slutet av upptagningsfasen avviker från den ursprungliga koncentrationen med mer än 30 %, bör även jordprover som tagits andra dagar analyseras.
45. Ta bort maskarna i ett givet replikat varje gång prover ska tas (t.ex. genom att sprida ut jorden på en grund bricka och plocka bort maskarna med en mjuk guldsmedstång), och skölj dem snabbt i vatten på en grund glas- eller stålbricka. Avlägsna överflödigt vatten (se punkt 34). Överför maskarna försiktigt till ett förhandsvägt kärl och väg omedelbart kärlet plus maskar inklusive tarminnehåll.
46. Därefter bör dagmaskarna (*Eisena* sp.) lämnas över natten för tömning av tarminnehåll, t.ex. på ett fuktat filterpapper i en täckt petriskål (se punkt 34). Efter tömningen bestäms maskarnas vikt i syfte att bedöma eventuell minskning av biomassa under testet (se giltighetskriterierna i punkt 17). Vägning och vävnadsanalys av enchytraeider görs utan tarmtömning, eftersom detta är tekniskt svårt på grund av att maskarna är så små. Efter slutlig viktbestämning bör maskarna avlivas omedelbart med lämpligaste metod (t.ex. med flytande kväve eller nedfrysning under 18 °C).
47. Under elimineringsfasen ersätter maskarna förorenat tarminnehåll med ren jord. Det betyder att mätningar i otömda maskar (i detta fall enchytraeider) som tas ut omedelbart före elimineringsfasen inkluderar förorenad jord i tarmen. För vattenlevande oligochaeter antas att största delen av förorenat tarminnehåll har ersatts med rent sediment efter de första 4–24 timmarna av elimineringsfasen (se t.ex. (46)). Liknande resultat har rapporterats för dagmaskar i studier rörande ackumulering av radioaktivmärkt kadmium och zink (78). För icke-tömda enchytraeider kan koncentrationen i detta första prov från elimineringsfasen anses vara koncentrationen i vävnad efter tarmtömning. För att beakta den utspädning av testämneskoncentrationen som kan tillskrivas oförorenad jord under elimineringsfasen kan tarminnehållets vikt uppskattas från förhållandena mellan maskarnas vätvikt/askvikt eller torrsvikt/askvikt.
48. Jord- och maskproverna bör helst analyseras omedelbart efter att de tagits (inom 1–2 dagar) för att undvika nedbrytning eller andra förluster, och det rekommenderas att ungefärliga värden för upptagning och eliminering beräknas medan testet framskrider. Om analysen måste vänta, bör proverna förvaras på lämpligt sätt, t.ex. i djupfrysform (≤ -18 °C).
49. Kontroll bör göras av att den kemiska analysens precision och reproducerbarhet, såväl som extraktion av testkemikalie från jord- och maskproverna är tillfredsställande för den metod det gäller, och extraktionseffektiviteten, detektionsgränsen (LOD) och kvantifieringsgränsen (LOQ) bör rapporteras. Dessutom bör man kontrollera att testkemikalien inte kan detekteras i kontrollkärnen i koncentrationer som är högre än bakgrunden. Om koncentrationen av testkemikalie i testorganismen C_a är > 0 i kontrollmaskarna, bör detta inkluderas i beräkningen av de kinetiska parametrarna (se tillägg 2). Genom hela testet bör alla prover hanteras med tanke på minsta möjliga förorening och förlust (t.ex. till följd av att testkemikalien adsorberas på provtagningsutrustningen).

50. När radioaktivitetsmärkta testkemikalier används är det möjligt att analysera ursprunglig kemikalie och metaboliter. Kvantifiering av ursprunglig testkemikalie och metaboliter vid stabilt tillstånd eller i slutet av upptagningsfasen ger viktig information. Proverna bör sedan putsas upp så att den ursprungliga testkemikalien kan kvantifieras separat. Om mängden av en enskild metabolit överskrider 10 % av den totala radioaktiviteten i det analyserade provet (de analyserade proverna) rekommenderas identifiering av dessa metaboliter.
51. Det totala utbytet, och utbytet av testkemikalie i maskar, jord och i förekommande fall fallor med adsorbenter som fångar upp avdunstad testkemikalie, bör registreras och rapporteras.
52. Pooling av enskilda prover från ett givet testkärl godtas för enchytraeider som är mindre än daggmaskar. Om pooling inbegriper minskning av antalet replikat, begränsas de statistiska förfaranden som kan användas på erhållna data. Om det krävs ett specifikt statistiskt förfarande och en specifik tyngd, bör testet omfatta tillräckligt många replikatkärl för att få den pooling, det förfarande och den tyngd som önskas.
53. Det rekommenderas att BAF uttrycks både som funktion av total torrsvikt och, när så krävs (t.ex. för starkt hydrofoba kemikalier), som en funktion av fetthinnehållet. Lämpliga metoder bör användas för bestämning av fetthinnehållet (vissa befintliga metoder, t.ex. (31) (58), bör anpassas för ändamålet). Dessa metoder bygger på en kloroform/metanol-extraktionsteknik. För att undvika klorerade lösningsmedel bör en modifiering av Blich och Dyer-metoden (9) enligt beskrivningen i (17) användas. Eftersom de olika metoderna inte ger identiska värden, är det viktigt att beskriva den metod som använts. Om det är möjligt, dvs. om det finns tillräckligt med maskvävnad att tillgå, bör analysen av fetthinnehåll helst göras på samma prov eller extrakt som det som används för analys av testkemikalien, eftersom fetterna ofta måste avlägsnas från extraktet innan det kan analyseras kromatografiskt (49). Alternativt kan kontrolldjur användas för att mäta fetthinnehållet, som sedan kan användas för att normalisera BAF-värdena. Det senare förfarandet minskar föroreningen av utrustningen med testkemikalien.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

54. Upptagningskurvan för testkemikalien erhålls genom att plotta koncentrationen $i/på$ maskarna under upptagningsfasen mot tiden enligt aritmetisk skala. När kurvan har nått en plåtå eller stabilt tillstånd (se definitionerna i tillägg 1) kan bioackumuleringsfaktorn vid stabilt tillstånd BAF_{ss} beräknas enligt följande:

$$\frac{C_a \text{ vid stabilt tillstånd eller slutet av upptagningsfasen (genomsnitt)}}{C_s \text{ vid stabilt tillstånd eller slutet av upptagningsfasen (genomsnitt)}}$$

C_a är testkemikalien koncentration i testorganismen

C_s är testkemikalien koncentration i jorden

55. Om stabilt tillstånd inte uppnås bör man i stället för att bestämma BAF_{ss} bestämma BAF_K på grundval av upptagnings- och elimineringskonstanterna, enligt följande:

— Bestäm ackumuleringsfaktorn (BAF_K) som kvoten k_s/k_e .

— Upptagning och eliminering ska helst beräknas samtidigt (se ekvation 11 i tillägg 2).

— Elimineringskonstanten (k_e) bestäms i regel från elimineringskurvan (koncentrationen av testämnet i maskarna under elimineringsfasen). Därefter beräknas upptagningskonstanten k_u utifrån k_e , och ett värde på C_a som härleds från upptagningskurvan – se tillägg 2 för en beskrivning av dessa metoder. För att få BAF_K och konstanterna k_s och k_e rekommenderas datorstödda icke-linjära parameteruppskattningsmetoder. Om elimineringen uppenbart inte är av första ordningen bör mer komplexa modeller användas.

Testrapport

56. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

- All tillgänglig information om akut toxicitet eller långtidstoxicitet (t.ex. EC_{50} , LC_{50} , NOEC) av testkemikalien på jordlevande oligochaeter.
- Renhet, fysikalisk natur och fysikalkemiska egenskaper, t.ex. $\log K_{ow}$, vattenlöslighet.
- Kemisk identifiering, källa, identitet och koncentration för eventuella lösningsmedel som använts.
- Om radioaktivmärkta testkemikalier används, uppgifter om exakt position för de märkta atomerna, specifik radioaktivitet och radiokemisk renhet.

Testarter:

- Vetenskapligt namn, stam, eventuell förbehandling, acklimatisering, ålder, storleksintervall osv.

Testbetingelser:

- Testförfarande.
- Belysningens typ, egenskaper och ljusperiod(er).
- Testets utformning (t.ex. antalet kärl, kärlstorlek, jordmassa, jordlagrets tjocklek, antalet replikat, antalet maskar per replikat, antalet testkoncentrationer, upptagnings- och elimineringsfasernas varaktighet samt provtagningsfrekvens).
- Motivering för valet av testkärlens material.
- Metod för beredning och applicering av testämne samt motivering för valet av en specifik metod.
- Nominella testkoncentrationer, medelvärde för uppmätta värden och deras standardavvikelse i testkärlen och metoden för att erhålla dessa värden.
- Källa för beståndsdelarna i syntetisk jord eller – om naturligt medium används – jordens ursprung, beskrivning av eventuell förbehandling, resultat för kontrollerna (överlevnad, utveckling av biomassa och reproduktion), jordens egenskaper (pH, totalhalten organiskt kol, partikelstorleksfördelning (procent sand, dy och lera), WHC_{max} , procentandelen vatten vid testets början och slut samt alla andra mätningar som har gjorts).
- Detaljerad information om behandling av jord- och maskprover, inbegripet detaljer om beredning, lagring, spikningsförfaranden, extraktion och analytiska förfaranden (inklusive precision) för testämne i maskar och jord, fettinnehåll (om uppmätt) och utbyte för testämnet.

Resultat:

- Mortalitet för kontrollmaskarna och maskarna i varje testkärl och allt observerat onormalt beteende (t.ex. undvikande av jorden och utebliven reproduktion i bioackumuleringsstest med enchytraeider).
- Förhållandet mellan torrsvikt och våtsvikt för jorden och testorganismerna (utnyttjas vid normalisering).
- Maskarnas våtsvikt vid varje provtagningstidpunkt; för dagmaskar våtsviktarna vid testets början och vid varje provtagningstidpunkt före och efter tarmtömning.
- Testorganismernas fettinnehåll (om detta bestäms).

- Kurvor som visar upptagnings- och elimineringskinetiken för testkemikalien i maskarna och tiden fram till stabilt tillstånd.
- C_a och C_s (med standardavvikelse och område, om lämpligt) för alla provtagningstidpunkter (C_a uttryckt som g per kg våtvikt och torrsvikt för hela kroppen, C_s uttryckt som g per kg våtvikt och torrsvikt för jord). Om det krävs en ackumuleringsfaktor biota-jord (BSAF) (t.ex. för jämförelse av resultat från två eller flera test med djur som har olika fetthinnehåll), kan C_a även uttryckas som g per kg fetthinnehåll i organismen och C_s kan uttryckas som g per kg organiskt kol i jorden.
- BAF (uttryckt som kg jord per kg mask), jordens upptagningskonstant k_s (uttryckt som g jord per kg mask per dag) och elimineringskonstanten k_e (uttryckt per dag), BSAF (uttryckt som kg totalt organiskt kol i jorden per kg fetthinnehåll i mask) kan också rapporteras.
- Om uppmätt: procentandelen ursprunglig kemikalie, metaboliter och bundna rester (den procentandel testkemikalie som inte kan extraheras med vanliga extraktionsmetoder) som detekteras i jord och testdjur.
- Metoder som använts för statistiska analyser av data.

Utvärdering av resultaten

- Resultatens överensstämmelse med giltighetskriterierna som förtecknas i punkt 17.
- Oförväntade eller ovanliga resultat, t.ex. ofullständig eliminering av testkemikalien från testdjuren.

LITTERATUR

- (1) Amorim M. (2000), "Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ -HCH) in the Enchytraeid *Enchytraeus albidus*", examensarbete, University Coimbra.
- (2) ASTM (2000), "Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates", *American Society for Testing and Materials*, E 1688–00a.
- (3) ASTM International (2004), "Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*", *ASTM International* (2004), s. 26.
- (4) Beek B., Boehling S., Bruckmann U., Franke C., Joehncke U., Studinger G. (2000), "The assessment of bioaccumulation", I Hutzinger, O. (red.) *The Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek), "Bioaccumulation - New Aspects and Developments", Springer-Verlag Berlin Heidelberg, s. 235–276.
- (5) Belfroid A., Sikkenk M., Seinen W., Van Gestel C., Hermens J. (1994), "The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil", *Environ. Toxicol. Chem.* 13, s. 93–99.
- (6) Belfroid A., Van Wezel A., Sikkenk M., Van Gestel C., Seinen W. och Hermens J. (1993), "The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water", *Ecotox. Environ. Safety* 25, s. 154–165.
- (7) Belfroid A., Meiling J., Drenth H., Hermens J., Seinen W., Van Gestel C. (1995), "Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*)", *Ecotox. Environ. Safety* 31, s. 185–191.
- (8) Bell A. W. (1958), "The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*", *ann. Mus. Novitat.* 1902, s. 1–13.
- (9) Bligh E. G. och Dyer W. J. (1959), "A rapid method of total lipid extraction and purification", *Can. J. Biochem. Pysiol.* 37, s. 911–917.
- (10) Bouche M. (1972), "Lombriciens de France. Ecologie et Systematique", INRA, *Annales de Zoologie-Ecologie animale*, Paris, s. 671.

- (11) Bruns E., Egeler Ph., Moser T., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001a), "Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten", rapport till tyska federala miljöbyrån (Umweltbundesamt Berlin), R&D nr 298, s. 64–416.
- (12) Bruns E., Egeler Ph., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001b), "Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida)", *Hydrobiologia* 463, s. 185–196.
- (13) Conder J. M. och Lanno R. P. (2003), "Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*", *J. Soils Sediments* 3, s. 13–20.
- (14) Connell D. W. och Markwell R. D. (1990), "Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System", *Chemosphere* 20, s. 91–100.
- (15) Didden W. A. M. (1993), "Ecology of Terrestrial Enchytraeidae", *Pedobiologia* 37, s. 2–29.
- (16) Didden W. (2003), "Oligochaeta", i *Bioindicators and biomonitors*, Markert, B. A., Breure, A.M. och Zechmeister, H. G. (red.) Elsevier Science Ltd, Nederländerna, s. 555–576.
- (17) De Boer J., Smedes F., Wells D., Allan A. (1999), "Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish", Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- (18) Dietrich D. R., Schmid P., Zweifel U., Schlatter C., Jenni-Eiermann S., Bachmann H., Bühler U., Zbinden N. (1995), "Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study" *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29, s. 140–145.
- (19) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 av den 18 december 2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach), inrättande av en europeisk kemikaliemyndighet, ändring av direktiv 1999/45/EG och upphävande av rådets förordning (EEG) nr 793/93 och kommissionens förordning (EG) nr 1488/94 samt rådets direktiv 76/769/EEG och kommissionens direktiv 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG och 2000/21/EG, EUT L 396, 30.12.2006, s. 1.
- (20) Edwards C. A. och Bohlen P. J. (1996), "Biology and ecology of earthworms", Tredje utgåvan, Chapman & Hall, London, s. 426.
- (21) OECD (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates*, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- (22) Egeler Ph., Gilberg D., Scheffczyk A., Moser Th. och Römbke J. (2009), "Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten)", rapport till tyska federala miljöbyrån (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D nr 204 67 458, s. 149. Finns för nedladdning på: <http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf>
- (23) Elmegaard N. och Jagers op Akkerhuis G. A. J. M. (2000), "Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations", National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325, s. 57.
- (24) Environment Canada (1995), "Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant", *Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30*.
- (25) EPPO (2003), "Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions", EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33, s. 195–208.
- (26) Franke C. (1996), "How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?", *Chemosphere* 32, s. 1897–1905.

- (27) Franke C., Studinger G., Berger G., Böhling S., Bruckmann U., Cohors-Fresenborg D., Jöhncke U., (1994), "The assessment of bioaccumulation", *Chemosphere* 29, s. 1501–1514.
- (28) Füll C. (1996), "Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae)", Dissertation University Mainz, s. 156.
- (29) Füll C., Schulte C., Kula C. (2003), "Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer", *UWSF - Z. Umweltchem, Ökotox.* 15, s. 78–84.
- (30) Gabric A. J., Connell D. W., Bell P. R. F. (1990), "A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes", *Wat. Res.* 24, s. 1225–1231.
- (31) Gardner W. S., Frez W. A., Cichocki E. A., Parrish C. C. (1985), "Micromethods for lipids in aquatic invertebrates", *Limnology and Oceanography* 30, s. 1099–1105.
- (32) Hawker D. W. och Connell D. W. (1988), "Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish", *Wat. Res.* 22, s. 701–707.
- (33) Hund-Rinke K. och Wiechering H. (2000), "Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests", *J. Soils Sediments* 1, s. 15–20.
- (34) Hund-Rinke K., Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000), "Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests" ingår i "Toxikologische Beurteilung von Böden", Heiden, S., Erb, R., Dott, W. och Eisentraeger, A. (red.), Spektrum Verl., Heidelberg, s. 59–81.
- (35) ISO 11268–2 (1998), *Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida)*. Del 2: *Determination of effects on reproduction*.
- (36) Jaenike J. (1982), "Eisenia foetida is two biological species", *Megadrilogica* 4, s. 6–8.
- (37) Jager T. (1998), "Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta)", *Environ. Toxicol. Chem.* 17, s. 2080–2090.
- (38) Jager T., Sanchez P. A., Muijs B., van der Welde E., Posthuma L. (2000), "Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil", *Environ. Toxicol. Chem.* 19, s. 953–961.
- (39) Jager T., Baerselman R., Dijkman E., De Groot A. C., Hogendoorn E. A., DeJong A., Kruitbosch J. A. W., Peijnenburg W. J. G. M. (2003a), "Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures", *Environ. Toxicol. Chem.* 22, s. 767–775.
- (40) Jager T., Fleuren R. L. J., Hoogendoorn E., de Korte G. (2003b), "Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta)", *Environ. Sci. Technol.* 37, s. 3399–3404.
- (41) Janssen M. P. M., Bruins A., De Vries T. H., Van Straalen N. M. (1991), "Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species", *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20, s. 305–312.
- (42) Kasprzak K. (1982), "Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems", *Pedobiologia* 23, s. 217–232.
- (43) Khalil A. M. (1990), "Aufnahme und Metabolismus von ¹⁴C-Hexachlorbenzol und ¹⁴C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern", *Dissertation University München*, s. 137.
- (44) Landrum P. F. (1989), "Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*", *Environ. Sci. Toxicol.* 23, s. 588–595.

- (45) Marinussen M. P. J. C., Van der Zee S. E. A. T. M., De Haan F. A. (1997), "Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions", *Ecotox. Environ. Safety* 36, s. 17–26.
- (46) Mount D. R., Dawson T. D., Burkhard L. P. (1999), "Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates*", *Environ. Toxicol. Chem.* 18, s. 1244–1249.
- (47) Nendza M. (1991), "QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow} /log BCF correlations", i R. Nagel och R. Loskill (red.): *Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop*, Berlin 1990, VCH, Weinheim.
- (48) Kapitel C.8 i denna bilaga, Toxicitet hos dagmaskar.
- (49) Kapitel C.13 i denna bilaga, Biokoncentration: Genomflödesprovning med fisk.
- (50) Kapitel C.21 i denna bilaga, Jordlevande mikroorganismer: Test rörande omvandling av kväve.
- (51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- (52) OECD (2004b), Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida*/*Eisenia Andrei*), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- (53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- (54) Petersen H. och Luxton M. (1982), "A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes", *Oikos* 39, s. 287–388.
- (55) Phillips D. J. H. (1993), "Bioaccumulation", ingår i *Handbook of Ecotoxicology* Vol. 1, Calow P. (red.). Blackwell Scientific Publ., Oxford, s. 378–396.
- (56) Pflugmacher J. (1992), "Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffizienten", *UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox.* 4, s. 77–81.
- (57) Posthuma L., Weltje L., Anton-Sanchez F. A. (1996), "oint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida*", *RIVM Report No. 607506001*, Bilthoven.
- (58) Randall R. C., Lee II H., Ozretich R. J., Lake J. L., Pruell R. J. (1991), "Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation", *Environ.Toxicol. Chem.* 10, s. 1431–1436.
- (59) Römbke J., Egele P., Füll C. (1998), "Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium", *UBA-Texte* 28/98, 84 S.
- (60) Römbke J. och Moser Th. (1999), "Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test" *UBA-Texte* 4/99, s. 373.
- (61) Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000), "Enchytraeen als Testorganismen", i "Toxikologische Beurteilung von Böden", Heiden S., Erb, R., Dott, W. och Eisentraeger, A. (reds), *Spektrum Verl.*, Heidelberg, s. 105–129.
- (62) Romijn CA. FM., Luttik R., Van De Meent D., Slooff W., Canton J. H. (1993), "Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains", *Ecotox. Envir. Safety* 27, s. 107–127.

- (63) Sample B. E., Suter D. W., Beauchamp J. J., Efroymson R. A. (1999), "Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation", *Environ. Toxicol. Chem.* 18, s. 2110–2120.
- (64) Schlosser H. J. och Riepert F. (1992), "Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung", *Zool. Beitr. NF* 34, s. 413–433.
- (65) Schmelz R. och Collado R. (1999), "*Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida)", *Carolinea* 57, s. 93–100.
- (66) Sims R. W. och Gerard B. M. (1985), "Earthworms", i Kermack D. M. och Barnes R. S. K. (Hrsg.), *Synopses of the British Fauna (New Series)* nr 31, 171 S, London, E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.
- (67) Sousa J. P., Loureiro S., Pieper S., Frost M., Kratz W., Nogueira A. J. A., Soares A.M. V. M. (2000), "Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod", *Environ. Toxicol. Chem.* 19, s. 2557–2563.
- (68) Spacie A. och Hamelink J. L. (1982), "Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish", *Environ. Toxicol. Chem.* 1, s. 309–320.
- (69) Stephenson G. L., Kaushik A., Kaushik N. K., Solomon K. R., Steele T., Scroggins R. P. (1998), "Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms", ingår i "Advances in earthworm ecotoxicology", Sheppard S., Bembridge J., Holmstrup M., Posthuma L. (red.), *Setac Press*, Pensacola, s. 67–81.
- (70) Sterenborg I., Vork N. A., Verkade S. K., Van Gestel C. A. M., Van Straalen N. M. (2003), "Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*", *Environ. Toxicol. Chemistry* 22, s. 1167–1171.
- (71) UBA (Umweltbundesamt) (1991), "Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug", *UBA-Texte* 42/91, Berlin.
- (72) US EPA (2000), "Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates", andra utgåvan, EPA 600/R-99/064, US Environmental Protection Agency, Duluth, MN, mars 2000.
- (73) Van Brummelen T. C. och Van Straalen N. M. (1996), "Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*", *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, s. 277–285.
- (74) Van Gestel C. A. M. 1992), "The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review", i *Ecotoxicology of Earthworms* (red. Becker H., Edwards, P.J., Greig-Smith P. W. och Heimbach F.). Intercept Press, Andover (GB).
- (75) Van Gestel C. A. och Ma W. C. (1990), "An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies", *Chemosphere* 21, s. 1023–1033.
- (76) Van Straalen N. M., Donker M. H., Vijver M. G., van Gestel C. A. M. (2005), "Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates", *Environmental Pollution* 136, s. 409–417.
- (77) Venter J. M. och Reinecke A. J. (1988), "The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta)", *South African J. Zool.* 23, s. 161–165.
- (78) Vijver M. G., Vink J. P. M., Jager T., Wolterbeek H. T., van Straalen N. M., van Gestel C. A. M. (2005), "Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil", *Soil Biol. Biochem.* 37, s. 1843–1851.
- (79) Widianarko B. och Van Straalen N. M. (1996), "Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals", *Environ. Toxicol. Chem.* 15, s. 402–406.

Tillägg 1

DEFINITIONER

bioackumulering: ökningen av testkemikalies koncentration i eller på en organism i förhållande till testkemikalies koncentration i det omgivande mediet. Bioackumulering uppstår till följd av både biokoncentrations- och biomagnifieringsprocesser (se nedan).

biokoncentration: ökningen av testkemikalies koncentration i eller på en organism till följd av upptagning av kemikalien som endast sker från det omgivande mediet (t.ex. via kroppsytan och förtärd jord) i förhållande till testkemikalies koncentration i det omgivande mediet.

biomagnifiering: ökningen av testkemikalies koncentration i eller på en organism, främst till följd av upptagning från förorenad föda eller förorenat byte, i förhållande till testkemikalies koncentration i födan eller bytet. Biomagnifiering kan leda till överföring eller ackumulering av testämnet inom näringsvävar.

eliminering: eliminering av en testkemikalie betyder att kemikalien avlägsnas från testorganismens vävnad genom aktiva eller passiva processer som inträffar oberoende av om testämnet finns eller inte finns i det omgivande mediet.

bioackumuleringsfaktor (BAF): den koncentration av testkemikalien under valfri tidpunkt under upptagningsfasen som förekommer i eller på testorganismen (C_a uttryckt som g per kg torrvtikt mask) dividerad med testkemikalies koncentration i det omgivande mediet (C_s uttryckt som g per kg torrvtikt jord); BAF uttrycks med enheten kg jord per kg mask.

bioackumuleringsfaktor vid stabilt tillstånd (BAF_{ss}): den BAF som gäller vid stabilt tillstånd och som inte förändras betydligt över en längre tidsperiod medan koncentrationen av testkemikalie i det omgivande mediet (C_s uttryckt som g per kg torrvtikt jord) är konstant under denna tidsperiod.

kinetisk bioackumuleringsfaktor (BAF_k): de bioackumuleringsfaktorer som beräknas direkt från förhållandet mellan upptagningskonstant och elimineringskonstant (k_s och k_e , se nedan).

bioackumuleringsfaktor biota-jord (BSAF): den fettnormaliserade koncentrationen av testkemikalien i eller på testorganismen dividerad med den organiskt kol-normaliserade koncentrationen av testkemikalien vid stabilt tillstånd. C_a uttrycks som g per kg fettinnehåll i organismen och C_s som g per kg organiskt innehåll i jorden; BSAF har enheten kg organiskt kol per kg fett.

plåtå eller stabilt tillstånd: jämvikt råder mellan upptagnings- och elimineringsprocesser som inträffar samtidigt under exponeringsfasen. Stabilt tillstånd syns i kurvan över BAF mot tiden när kurvan blir parallell med tidsaxeln och tre på varandra följande analyser av BAF på prover som tagits med minst två dagars mellanrum ligger inom 20 % från varandra, och det inte finns några statistiskt signifikanta skillnader mellan de tre provtagningsperioderna. För testkemikalier som tas upp långsamt är det lämpligare med ett intervall på sju dagar (49).

fördelningskoefficienten organiskt kol-vatten (K_{oc}): förhållandet mellan en kemikalies koncentration i eller på jordens fraktion av organiskt kol och kemikalies koncentration i vatten vid jämvikt.

fördelningskoefficienten oktanol-vatten (K_{ow}): förhållandet mellan en kemikalies löslighet i n-oktanol och i vatten vid jämvikt; uttrycks även som P_{ow} . Logaritmen av K_{ow} ($\log K_{ow}$) används som indikator för en kemikalies potential för bioackumulering i vattenlevande organismer.

upptagnings- eller exponeringsfasen: den tid under vilken testorganismerna är exponerade för testkemikalien.

upptagningskonstant (k_s): ett numeriskt värde som definierar hur snabbt koncentrationen av testämnet ökar i eller på testorganismen till följd av upptagning från jordfasen; k_s uttrycks som g jord per kg mask per dag.

elimineringsfas: den tid efter överföringen av testorganismerna från ett förorenat medium till ett medium som inte innehåller testämne, under vilken eliminering (eller nettoförlust) av kemikalien från testorganismerna studeras.

elimineringskonstant (k_e): det numeriska värde som definierar reduktionshastigheten för koncentrationen av testämne i eller på testorganismen efter överföring av testorganismerna från ett medium som innehåller testämnet till ett medium som inte innehåller testämnet; k_e uttrycks som d^{-1} .

testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

Tillägg 2

Beräkning av upptagnings- och elimineringsparametrar

Den huvudsakliga endpointen för ett bioackumuleringstest är bioackumuleringsfaktorn BAF. Uppmätt BAF kan beräknas genom att dividera koncentrationen i testorganismen C_a med koncentrationen i jorden C_s vid stabilt tillstånd. Om stabilt tillstånd inte uppnås under upptagningsfasen beräknas BAF_K utifrån konstanterna i stället för utifrån BAF_{SS} . Det bör dock finnas en anmärkning om huruvida BAF är baserat på koncentrationer vid stabilt tillstånd eller inte.

Den vanliga metoden för att få fram kinetisk bioackumuleringsfaktor (BAF_K), upptagningskonstant (k_s) och elimineringskonstant (k_e) är att använda icke-linjära datorbaserade parameteruppskattningsmetoder, t.ex. baserade på de modeller som beskrivs i (68). Utifrån en viss uppsättning sekventiella tid-koncentrationsdata och modellekvationerna

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k} e^t) \quad 0 < t < t_c \quad (\text{ekvation 1})$$

eller

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k} e^{(t-t_c)} - e^{-k} e^t) \quad t > t_c \quad (\text{ekvation 2})$$

där

C_a = koncentrationen kemikalie i maskar (g per kg våt- eller torrsvikt)

k_s = upptagningshastigheten i vävnad (g jord per kg mask per dag)

C_s = koncentrationen kemikalie i jord (g per kg våt- eller torrsvikt)

k_e = elimineringskonstant (d^{-1})

t_c = tidpunkten vid slutet av upptagningsfasen

beräknar dessa datorprogram värden för BAF_K , k_s och k_e .

Om bakgrundskoncentrationen i icke-exponerade maskar t.ex. på dag 0 avviker betydligt från noll (kan vara fallet t.ex. för metaller) bör denna bakgrundskoncentration $C_{a,0}$ införlivas i ekvationerna, enligt följande:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k} e^t) \quad 0 < t < t_c \quad (\text{ekvation 3})$$

och

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k} e^{(t-t_c)} - e^{-k} e^t) \quad t > t_c \quad (\text{ekvation 4})$$

Om en signifikant minskning av testkemikaliekoncentrationen i jorden kan observeras över tid under upptagningsfasen, kan följande modeller användas, t.ex. (67) (79):

$$C_s = C_0 (e^{-k_0 t}) \quad (\text{ekvation 5})$$

där

C_s = kemikaliekoncentrationen i jorden (g per kg våt- eller torrsvikt)

k_0 = sönderfallskonstant i jord (d^{-1})

C_0 = ursprunglig kemikaliekoncentration i jord (g per kg våt- eller torrsvikt)

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^t) \quad 0 < t < t_c \quad (\text{ekvation 6})$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t_c} * e^{-k(t-t_c)} \quad t > t_c \quad (\text{ekvation 7})$$

där

C_a = koncentrationen kemikalie i maskar (g per kg våt- eller torrsvikt)

k_s = upptagningshastigheten i vävnad (g jord per kg mask per dag)

k_0 = sönderfallskonstant i jord (d^{-1})

k_e = elimineringskonstant (d^{-1})

t_c = tidpunkten vid slutet av upptagningsfasen.

Om stabilt tillstånd nås under upptagningsfasen (t.ex. $t = \infty$) kan ekvation 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k} e^t) \quad 0 < t < t_c \quad (\text{ekvation 1})$$

reduceras till

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

eller

$$C_a/C_s = k_s/k_e = \text{BAF}_K \quad (\text{ekvation 8}).$$

Då är $k_s/k_e \times C_s$ en tillnärmning av testämneskoncentrationen i maskvävnad vid stabilt tillstånd ($C_{a,ss}$).

Accumuleringsfaktorn biota-jord (BSAF) kan beräknas enligt följande:

$$\text{BSAF} = \text{BAF}_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \quad (\text{ekvation 9})$$

där f_{oc} är fraktionen organiskt kol i jorden och f_{lip} är fraktionen fett i maskar, båda helst bestämda på prover som tagits i testet och på grundval av torrsvikt eller våtsvikt.

Elimineringskinetiken kan modelleras med stöd av data från elimineringsfasen och med tillämpning av följande modell-ekvation och en datorstödd icke-linjär metod för modelluppskattning. Om datapunkterna plottade mot tiden indikerar en konstant exponentiell minskning av testämneskoncentrationen i djuren, kan en one-compartment-modell (ekvation 9) användas för att beskriva elimineringsens tidsförlopp.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^t \quad (\text{ekvation 10})$$

Elimineringsprocesserna verkar i bland ha två faser med en snabb minskning av C_a till en början och därefter en långsammare avgång av testämne senare under elimineringen, t.ex. (27) (68). De två faserna kan tolkas genom antagande om att det finns två olika enheter i organismen från vilka testämnet avgår med olika hastigheter. I sådana fall bör information inhämtas från specifik litteratur, t.ex. (38) (39) (40) (78).

Med användning av modellekvationerna ovan kan de kinetiska parametrarna k_s och k_e även kalkyleras i ett steg genom att samtidigt tillämpa modeller för första ordningens kinetik på alla data från både upptagnings- och elimineringsfasen. Beskrivning av en metod som ger möjlighet till en sådan kombinerad beräkning av upptagnings- och elimineringskonstanter kan sökas i hänvisningarna (41), (73) och (70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s (1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1) \right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e(t-t_c)} - e^{-k_e t}) \times (m = 2) \right] \quad (\text{ekvation 11})$$

Anmärkning: När upptagnings- och elimineringsparametrar uppskattas samtidigt utifrån kombinerade upptagnings- och elimineringsdata är "m" såsom visas i ekvation 11 en deskriptor som gör det möjligt för datorprogrammet att tilldela ekvationens subtermer till datauppsättningarna för respektive fas och göra utvärderingen korrekt ($m = 1$ för upptagningsfasen och $m = 2$ för elimineringsfasen).

Dessa modellekvationer bör dock användas med försiktighet, särskilt när det sker ändringar i testkemikalins biotillgänglighet eller om (bio)nedbrytning sker under testet (se t.ex. (79)).

Tillägg 3

EXEMPEL PÅ SCHEMAN FÖR TEST AV BIOACKUMULERING FRÅN JORDAR

Test med dagmaskar

a) Upptagningsfas med 8 provtagningsdatum som används för beräkning av kinetik.

Dag	Aktivitet
- 6	Konditionering av förberedd jord under 48 timmar.
- 4	Spikning av jordfraktionen med testkemikalielösning, avdunstning av eventuellt lösningsmedel, blandning av jordbeståndsdelarna, fördelning av jord i testkärlen och stabilisering till jämvikt under testbetingelserna i 4 dagar (3 veckor för metallspikad jord).
- 3 till - 1	Separation av testorganismerna från odlingen för aklimatisering, beredning och fuktning av jordbeståndsdelarna.
0	Mätning av temperatur och jordens pH, avlägsnande av jordprover från behandlade kärl och lösningsmedelskontroller för bestämning av testkemikaliers koncentration, tillsats av föda, vägning och slumpvis fördelning av maskarna till testkärlen med bibehållande av tillräckligt antal maskar för bestämning av analytiska bakgrundsvärden, våt- och torrsvikt och fettinnehåll, vägning av alla testkärl för kontroll av jordens fukthalt och kontroll av lufttillförsel om stängda test-system används.
1	Kontroll av lufttillförsel, registrering av maskarnas beteende och temperatur samt tagning av jord- och maskprover för bestämning av koncentrationen testämne.
2	Samma som dag 1.
3	Kontroll av lufttillförsel, maskarnas beteende och temperatur.
4	Samma som dag 1.
5-6	Samma som dag 3.
7	Samma som dag 1: tillförsel av föda, kontroll av jordens fukthalt genom vägning av testkärlen och vattenpåfyllnad motsvarande avdunstningen.
8-9	Samma som dag 3.
10	Samma som dag 1.
11-13	Samma som dag 3.
14	Samma som dag 1: tillförsel av föda, kontroll av jordens fukthalt genom vägning av testkärlen och vattenpåfyllnad motsvarande avdunstningen.
15-16	Samma som dag 3.
17	Samma som dag 1.
18-20	Samma som dag 3.
21	Samma som dag 1: mätning av temperatur och jordens pH, kontroll av jordens fukthalt genom vägning av testkärlen, slut på upptagningsfasen, överföring av maskarna från återstående exponerade replikat till kärl som innehåller ren jord för elimineringsfasen (ingen tarmtömning) samt provtagning av jord och maskar från lösningsmedelskontrollerna.
	Aktiviteterna före exponering (stabiliseringsfasen) bör tidplaneras med beaktande av testkemikaliers egenskaper.
	Aktiviteterna för dag 3 bör genomföras dagligen (åtminstone på arbetsdagar).

b) Elimineringssfas

Dag	Aktivitet
- 6	Beredning och fuktning av jordens beståndsdelar samt konditionering av beredd jord i 48 timmar.
- 4	Blandning av jordens beståndsdelar, fördelning av jord till testkärnen och inkubation under testbetingelserna i 4 dagar.
0 (upptagningsfasens slut)	Mätning av temperatur och jordens pH, vägning och slumpmässig fördelning av maskar till testkärnen, tillförsel av föda, överföring av maskar från återstående exponerade replikat till kärn som innehåller ren jord samt tagning av jord- och maskprover efter 4–6 timmar för bestämning av testkemikalien koncentration.
1	Kontroll av lufttillförsel, registrering av maskarnas beteende och temperatur samt tagning av jord- och maskprover för bestämning av testkemikalien koncentration.
2	Samma som dag 1.
3	Kontroll av lufttillförsel, maskarnas beteende och temperatur.
4	Samma som dag 1.
5–6	Samma som dag 3.
7	Samma som dag 1: tillförsel av föda, kontroll av jordens fukthalt genom vägning av testkärnen och vattenpåfyllnad motsvarande avdunstningen.
8–9	Samma som dag 3.
10	Samma som dag 1.
11–13	Samma som dag 3.
14	Samma som dag 1: tillförsel av föda, kontroll av jordens fukthalt genom vägning av testkärnen och vattenpåfyllnad motsvarande avdunstningen.
15–16	Samma som dag 3.
17	Samma som dag 1.
18–20	Samma som dag 3.
21	Samma som dag 1: mätning av temperaturen och jordens pH, kontroll av jordens fuktighet genom vägning av testkärnen samt tagning av jord- och maskprover från lösningsmedelskontrollerna.
	Beredning av jorden före elimineringssfasens början bör göras på samma sätt som beredningen före upptagningsfasen.
	Aktiviteterna för dag 3 bör genomföras dagligen (åtminstone på arbetsdagar).

Test med enchytraeider

a) Upptagningsfas med 8 provtagningsdatum som används för beräkning av kinetik.

Dag	Aktivitet
- 6	Konditionering av förberedd jord under 48 timmar.
- 4	Spikning av jordfraktionen med testkemikalielösning, avdunstning av eventuellt lösningsmedel, blandning av jordbeståndsdelarna, fördelning av jord i testkärnen och stabilisering till jämvikt i testbetingelserna i 4 dagar (3 veckor för metallspikad jord).

Dag	Aktivitet
- 3 till - 1	Separation av testorganismerna från odlingen för aklimatisering, beredning och fuktning av jordbeståndsdelarna.
0	Mätning av temperatur och jordens pH, avlägsnande av jordprover från behandlade kärl och lösningsmedelskontroller för bestämning av testkemikaliens koncentration, tillsats av föda till jorden, vägning och slumpvis fördelning av maskarna till testkärlen med bibehållande av tillräckligt antal maskar för bestämning av analytiska bakgrundsvärden, våt- och torrsvikt och fettinnehåll, vägning av alla testkärl för kontroll av jordens fukthalt och kontroll av lufttillförsel om stängda testsystem används.
1	Kontroll av lufttillförsel, registrering av maskarnas beteende och temperatur samt tagning av jord- och maskprover för bestämning av koncentrationen testämne.
2	Samma som dag 1.
3	Kontroll av lufttillförsel, maskarnas beteende och temperatur.
4	Samma som dag 1.
5-6	Samma som dag 3.
7	Samma som dag 1: tillförsel av föda till jorden, kontroll av jordens fukthalt genom vägning av testkärlen och vattenpåfyllnad motsvarande avdunstningen.
9	Samma som dag 1.
10	Samma som dag 3.
11	Samma som dag 1.
12-13	Samma som dag 3.
14	Samma som dag 1: tillförsel av föda till jorden, mätning av temperaturen och jordens pH, kontroll av jordens fukthalt genom vägning av testkärlen; slut på upptagningsfasen; överföring av maskarna från återstående exponerade replikat till kärl som innehåller ren jord för elimineringsfasen (ingen tarmtömning) samt provtagning av jord och maskar från lösningsmedelskontrollerna.
	Aktiviteterna före exponering (stabiliseringsfasen) bör tidplaneras med beaktande av testkemikaliens egenskaper.
	Aktiviteterna för dag 3 bör genomföras dagligen (åtminstone på arbetsdagar).

Tillägg 4

Syntetisk jord – rekommendationer för beredning och lagring

Eftersom naturjordar från en viss källa inte alltid finns att tillgå under hela året, och ingående organismer och mikro-föreningar kan påverka testet, rekommenderas syntetiskt substrat, syntetisk jord enligt kapitel C.8 i denna bilaga, Toxicitet för dagmaskar (48), för användning i detta test. Flera olika testarter kan överleva, växa och föröka sig i denna jord, och den ger också maximal standardisering såväl som jämförbarhet inom och mellan laboratorier och odlings-betingelser.

Jordens beståndsdelar

Torv:	10 %	Sphagnum-torv, enligt OECD:s riktlinje 207 (48)
Kvartssand:	70 %	Industriell kvartssand (lufttorkad), minst 50 % av partiklarna bör ha en storlek inom området 50–200 µm, men alla partiklar bör vara ≤ 2 mm
Kaolinitlera:	20 %	Kaolinithalt ≥ 30 %
Kalciumkarbonat:	≤ 1 %	CaCO ₃ , pulveriserat, kemiskt rent

Alternativt kan jordens organiska kolhalt minskas, t.ex. genom att sänka torvhalten till 4–5 % av torrjord och öka sandhalten i motsvarande grad. Med en sådan minskning av halten organiskt kol kan möjligheterna till adsorption av testkemikalien till jorden (organiskt kol) minskas, och då blir testkemikalien bättre tillgänglig för maskarna (74). Det har demonstrerats att *Enchytraeus albidus* och *Eisenia fetida* kan uppfylla validitetskriterierna för reproduktion vid testning i fältjordar med lägre halt organiskt kol, t.ex. 2,7 % (33), (61), och det finns erfarenheter som visar att detta också kan uppnås i syntetisk jord med 5 % torv.

Beredning

Jordens torra beståndsdelar blandas omsorgsfullt (t.ex. i en storskalig laboratorieblandare). Detta bör göras cirka en vecka innan testet inleds. De blandade torra jordbeståndsdelarna bör fuktas med avjoniserat vatten minst 48 timmar före applicering av testämnet för att nå surhetsjämvikt. För bestämning av pH används en blandning av jord och 1 M lösning av KCl i förhållandet 1:5. Om pH-värdet inte ligger inom rekommenderat område (6,0 ± 0,5) bör tillräcklig mängd CaCO₃ tillföras jorden eller så måste en ny sats jord beredas.

Den syntetiska jordens maximala vattenhållningskapacitet (WHC) bestäms enligt ISO 11268-2 (35). Minst två dagar innan testet inleds fuktas den torra syntetiska jorden med tillräcklig mängd avjoniserat eller rekonstituerat vatten till en vattenhalt som motsvarar cirka hälften av den slutliga vattenhalten. Den slutliga vattenhalten bör vara cirka 40–60 % av maximal vattenhållningskapacitet (WHC). Vid teststart ska den förhandsfuktade jorden delas upp i lika många delar som antalet testkoncentrationer och kontroller som används för testet, och fukthalten justeras till 40–60 % av WHC_{max} genom användning av en lösning av testämnet och/eller genom tillförsel av avjoniserat eller rekonstituerat vatten. Fukthalten bestäms i början och i slutet av testet (vid 105 °C). Fukthalten bör vara optimal för den art som testas (fukthalten kan också kontrolleras genom att försiktigt krama jorden i handen och då bör det komma fram små vattendroppar mellan fingrarna).

Förvaring

De torra beståndsdelarna av syntetisk jord kan förvaras i rumstemperatur fram till användningen. Den förberedda förfuktade jorden kan förvaras i svalt utrymme i upp till tre dagar före spikningen, och vattenavdunstningen bör minimeras. Jord som spikats med testämne bör användas omedelbart, med undantag för om det finns information om att jorden i fråga kan förvaras utan att testämnets toxicitet och biotillgänglighet påverkas. Prover av spikad jord kan sedan förvaras i de förhållanden som rekommenderas för testsystemet i fråga fram till analys.

Tillägg 5

Arter av jordlevande oligochaeter som rekommenderas för testning av bioackumulering från jord**Daggmaskar**

Rekommenderad testart är *Eisenia fetida* (Savigny 1826), som tillhör familjen Lumbricidae. Från och med 1972 är den uppdelad i två underarter (*Eisenia fetida* och *Eisenia andrei* (10)). Enligt Jaenike (36) är dessa äkta, separata arter. *Eisenia fetida* känns lätt igen genom de klargula banden mellan segmenten medan *Eisenia andrei* har en enhetlig mörkröd färg. De härstammar sannolikt från Svartahavsregionen och finns numera över hela världen, särskilt i antropogent modifierade livsmiljöer såsom komposthögar. Båda kan användas för både ekotoxikologiska test och bioackumuleringstest.

Eisenia fetida och *Eisenia andrei* säljs allmänt på marknaden, t.ex. som fiskbete. Jämfört med andra daggmaskar (familjen Lumbricidae) har de en kort livscykel och når vuxenstadiet inom cirka 2–3 månader (vid rumstemperatur). Den optimala temperaturen för dessa daggmaskar ligger kring 20–24 °C. De föredrar relativt fuktiga substrat med nästan neutralt pH och en hög halt av organiskt material. Dessa arter har använts i stor utsträckning i standardiserade ekologiska tester i cirka 25 år och odling av dem är därför väl etablerad (48) (77).

Båda arterna kan odlas i ett stort urval djuravfall. Som odlingsmedium rekommenderas enligt ISO (35) en 50/50-blandning av häst- eller boskaps gödsel och torv. Mediet bör ha pH på cirka 6–7 (reglerat med kalciumkarbonat), låg jonisk konduktivitet (lägre än 6 mS/cm eller en salthalt under 0,5 %) bör inte ha för hög halt av ammoniak eller animaliskt urin. Likaså kan man använda kommersiell trädgårdsjord fri från tillsatser eller syntetisk jord enligt OECD (48) eller en 50/50-blandning av båda. Substratet bör vara fuktigt men inte för vått. Lämplig storlek på odlingslådorna är 10–50 liter.

För att få maskar med standardålder och standardmassa är det bäst att inleda odlingen med kokonger. För detta tillsätts vuxna maskar till en odlingslåda med färskt substrat för att de ska producera kokonger. Erfarenheterna har visat att en populationsdensitet på cirka 100 vuxna maskar per kg substrat (våtvikt) ger goda förökningsnivåer. Efter 28 dagar avlägsnas de vuxna maskarna. Daggmaskarna som kläcks ur kokonger används för testning när de har nått vuxenstadium efter minst 2 månader men högst 12 månader.

Maskar av de arter som beskrivs ovan kan anses vara friska om de rör sig genom substratet, inte försöker lämna substratet och förökar sig kontinuerligt. Mycket långsamma rörelser eller gul bakre del (i fråga om *Eisenia fetida*) tyder på utarmat substrat. Då rekommenderas färskt substrat och/eller mindre antal djur per låda.

Valda ytterligare hänvisningar

Gerard B. M. (1964), *Synopsis of the British fauna*, nr 6 Lumbricidae, *Linnean Soc. London*, 6, s. 1–58.

Graff O. (1953), "Die Regenwürmer Deutschlands", *Schr. Forsch. Anst. Landwirtschaft*, 7, s. 1–81.

Römbke J. E., Egeler P., Füll C. (1997), "Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium", *Bericht für das UBA*, F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S. (1977), "Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden", *Oikos* 28, s. 49–55.

Satchell J. E. (1955), "Some aspects of earthworm ecology", *Soil Zoology (Kevan)*, s. 180–201.

Sims R. W. och Gerard B. M. (1985), "A synopsis of the earthworms", *Linnean Soc. London*, 31, s. 1–171.

Tomlin A. D. (1984), "The earthworm bait market in North America", ingår i "Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture". Satchell, J.E. (red.), Chapman & Hall, London, s. 331–338.

Enchytraeider

Den rekommenderade testarten är *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (vit ringmask). *Enchytraeus albidus* är en av de största arterna (upp till 15 mm) bland ringmaskar (Annelida) i Oligochaetfamiljen Enchytraeidae och finns över hela världen, se t.ex. (8). *Enchytraeus albidus* finns i marina och limniska livsmiljöer och livsmiljöer på land, främst i multnande organiskt material (tång, kompost) men är sällsynt på ångar (42). Denna breda ekologiska tolerans och vissa morfologiska variationer tyder på att det kan finnas olika raser av denna art.

Enchytraeus albidus säljs allmänt på marknaden som fiskfoder. Kontroll bör göras av om odlingen är förorenad av andra, i regel mindre arter (60). Om förorening förekommer bör alla maskar tvättas med vatten i en petriskål. Stora vuxna exemplar av *Enchytraeus albidus* väljs sedan ut (med användning av stereomikroskop) för start av en ny odling. Alla

andra maskar kasseras. Livscykeln är kort eftersom maskarna blir könsmogna mellan 33 dagar (vid 18 °C) och 74 dagar (vid 12 °C). Endast odlingar som har hållits i laboratoriet minst 5 veckor (en generation) utan problem får användas för testning.

Även andra arter av *Enchytraeus* är lämpliga, särskilt *Enchytraeus luxuriosus*. Denna art är en äkta jordlevande mask, vilket nyligen har beskrivits i (65). Om andra arter av *Enchytraeus* används bör de identifieras tydligt och rapporten bör innehålla motivering för valet av denna art.

Enchytraeus crypticus (Westheide & Graefe 1992) är en art som tillhör samma grupp som *Enchytraeus luxuriosus*. Man har inte med säkerhet kunna bekräfta dess existens på fältet, eftersom den endast har beskrivits utifrån dagmaskodlingar och komposthögar (Römbke 2003). Artens ursprungliga ekologiska krav är därför inte kända. Nyligen gjorda laboratoriestudier av olika slags fältjordar har dock bekräftat att denna art har en bred tolerans när det gäller jordegenskaper som pH och textur (Jänsch m.fl. 2005). Under de senaste åren har denna art ofta använts i ekotoxikologiska studier eftersom den är lätt att odla och testa (se t.ex. Kuperman m.fl. 2003). Den är dock liten (3–12 mm, i genomsnitt 7 mm, Westheide & Müller 1996), vilket gör hanteringen svårare i jämförelse med *Enchytraeus albidus*. När denna art används i stället för *Enchytraeus albidus*, kan storleken på testkärlen vara mindre, men det är inget krav. Dessutom bör man beakta att arten förökar sig mycket snabbt med en generationstid på mindre än 20 dagar vid 20 ± 2 °C (Achazi m.fl. 1999) och ännu snabbare vid högre temperaturer.

Enchytraeider av arten *Enchytraeus albidus* (såväl som andra *Enchytraeus*-arter) kan odlas i stora plastlådor (t.ex. 30 × 60 × 10 cm eller 20 × 12 × 8 cm, som lämpar sig för odling av små maskar) fyllda med en blandning av syntetisk jord och allmänt tillgänglig oförorenad trädgårdsjord utan tillsatser. Kompostmaterial bör undvikas eftersom det kan innehålla giftiga kemikalier såsom tungmetaller. Fauna bör avlägsnas från odlingsjorden före användning genom djupfrysning i tre omgångar. Rent syntetisk jord kan också användas men då kan förökningshastigheten vara lägre jämfört med blandade substrat. Substratet bör ha pH 6,0 ± 0,5. Odlingen hålls i en inkubator vid 15 ± 2 °C utan ljus. Under alla omständigheter ska temperaturer över 23 °C undvikas. Jorden (syntetisk eller naturlig) ska vara fuktig men inte våt. När jorden kramas försiktigt i handen ska endast små vattendroppar komma fram. Under alla omständigheter bör anoxiska betingelser undvikas (om t.ex. lock används, bör det ha tillräckligt antal hål för att ge tillräcklig luftväxling). Odlingens jord bör luftas genom försiktig omblandning en gång per vecka.

Maskarna bör utfodras minst en gång per vecka ad libitum med havreflingor som placeras i en kavitet på jordens yta och täcks med jord. Om det finns kvar foder från föregående utfodring bör mängden foder justeras i motsvarande grad. Om det växer svamp på överblivet foder bör det ersättas med en ny mängd havreflingor. För att stimulera förökningen kan havreflingorna kompletteras med allmänt tillgängligt vitaminberikat proteinpulver varannan vecka. Efter tre månader överförs djuren till en färsk kultur eller färskt odlingssubstrat. Havreflingorna ska förvaras i kärll med tättslutande lock och bör behandlas i autoklav eller hettas upp före användning för att undvika infektion med mjölkvalster (t.ex. *Glyzophagus* sp., Astigmata, Acarina) eller rovkvalster (t.ex. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina). Efter desinfektering mals fodret så att det enkelt kan spridas på jordytan. En annan tänkbar foderkälla är bakningsjäst eller fiskfoder TetraMin®.

Allmänt taget gäller att odlingsbetingelserna är tillräckliga om maskarna inte försöker lämna substratet, rör sig snabbt genom jorden, har en glansig yta utan vidhäftande jordpartiklar, har en mer eller mindre vitaktig färg och det går att iakttä maskar av olika åldrar. Dessutom kan maskarna anses vara friska om de förökar sig kontinuerligt.

Valda ytterligare hänvisningar

Achazi R. K., Fröhlich E., Henneken M., Pilz C. (1999), "The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta)", *Newsletter on Enchytraeidae* 6, s. 117–126.

Jänsch S., Amorim M. J. B., Römbke J. (2005), "Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species", *Environ. Reviews* 13, s. 51–83.

Kuperman R. G., Checkai R. T., Simini M., Phillips C. T., Kolakowski J. E., Kurnas C. W., Sunahara G. I. (2003), "Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitroheterocyclic explosives RDX and HMX", *Pedobiologia* 47, s. 651–656.

Römbke J. (2003), "Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review", *Pedobiologia* 47, s. 607–616.

Westheide W. och Graefe U. (1992), "Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida)", *J. Nat. Hist.* 26, s. 479–488.

Westheide W. och Müller M. C. (1996), "Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology", *Hydrobiologia* 334, s. 263–267."