



Europeiska
unionens råd

Bryssel den 25 februari 2019
(OR. en)

6800/19
ADD 1

COMPET 206
ENV 212
CHIMIE 36
MI 195
ENT 53
SAN 104
CONSOM 77
EMPL 121
SOC 153

FÖLJENOT

från:	Europeiska kommissionen
inkom den:	22 februari 2019
till:	Rådets generalsekretariat
Ärende:	Bilaga till KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EU) .../... av den XXX om ändring, för anpassning till den tekniska utvecklingen, av bilagan till 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)

För delegationerna bifogas dokument – Annex to D060575/02.

Bilaga: Annex to D060575/02

SV

BILAGA

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

- 1) I del B ska kapitel B.4 ersättas med följande:

”B.4 AKUT HUDIRRITATION/HUDKORROSION**INLEDNING**

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 404 (2015). OECD:s riktlinjer för kemikalietestning ses över med jämna mellanrum för att säkerställa att de återspeglar bästa tillgängliga vetenskap. Under omarbetningen av OECD TG 404 lades särskild vikt vid möjliga förbättringar avseende djurskydd och vid utvärderingen av all tillgänglig information om testkemikalier för att undvika onödiga djurförsök. Den uppdaterade versionen av OECD TG 404 (antagen för första gången 1981 och omarbetad 1992, 2002 och 2015) innehåller referenser till vägledningsdokumentet om ett integrerat synsätt på testning och bedömning (IATA) av hudirritation/hudkorrosion (1) och ett förslag på moduler för testning av hudirritation och hudkorrosion. I vägledningsdokumentet om IATA beskrivs flera moduler som grupperar olika informationskällor och analysverktyg, och där det ges i) vägledning om hur tillgängliga testdata och icke testdata kan integreras och användas i bedömningen av kemikaliers potential för hudirritation och hudkorrosion, och ii) förslag på hur man ska gå till väga när det krävs ytterligare testning (1). I riktlinjen rekommenderas också att de tre testkompresserna, när så krävs, appliceras på djuret i följd, i stället för samtidigt, vid det inledande in vivo-testet.
2. Definitioner av hudirritation och hudkorrosion finns i tillägget till den här testmetoden.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

3. För en sund vetenskap och för djurs välbefinnande bör in vivo-testning inte utföras förrän alla relevanta data för den potentiella hudkorrosionen/hudirritationen orsakad av testkemikalien har utvärderats i en så kallad *weight-of-the-evidence-analysis* (WoE-analys) i enlighet med vägledningsdokumentet om ett integrerat synsätt på testning och bedömning (IATA) av hudkorrosion och hudirritation, dvs. i enlighet med dokumentets tre delar och deras respektive moduler (1). I del 1 ges en presentation av tillgängliga data i sju moduler som omfattar humandata, in vivo-data, in vitro-data, data om fysikalisk-kemiska egenskaper (t.ex. pH, särskilt starkt surt eller alkaliskt) samt metoder som inte innebär testning. I del 2 utförs en WoE-analys. Om WoE-analysen inte ger något entydigt resultat

ska del 3 genomföras med kompletterande testning, först med in vitro-metoder och sedan med in vivo-testning som en sista utväg. Genom analysen bör man kunna minska behovet av in vivo-testning med avseende på hudkorrosion/hudirritation av sådana testkemikalier för vilka det redan finns tillräckliga belägg från andra undersökningar för dessa två endpoints.

PRINCIP FÖR IN VIVO-TESTET

4. Testkemikalien appliceras som en engångsdos på försöksdjurets hud. Djurets obehandlade hudområden används som kontroll. Graden av irritation/korrosion granskas och poängsätts med specificerade intervall, och beskrivs närmare så att en fullständig utvärdering av effekterna erhålls. Testet bör pågå tillräckligt länge för att ge möjlighet att utvärdera om de observerade verkningarna är reversibla eller irreversibla.
5. Djur som uppvisar ihållande tecken på allvarligt lidande och/eller smärta i något skede av testet bör avlivas på ett skonsamt sätt, och detta bör beaktas vid utvärderingen av testkemikalien. Kriterier för att fatta beslut om skonsam avlivning av döende eller allvarligt lidande djur finns i ett separat vägledningsdokument (2).

FÖRBEREDELSE FÖR IN VIVO-TESTET

Val av djurart

6. Rekommenderat försöksdjur är albinokanin. Friska yngre adulta exemplar bör användas. Om andra arter används bör detta motiveras.

Förberedelse av djuren

7. Cirka 24 timmar före testet bör djurens päls avlägsnas genom kortklippning av flankens ryggsida. Varsamhet bör iakttas för att inte repa huden, och endast djur med frisk och intakt hud bör användas.
8. Kaniner av vissa stammar har områden med särskilt tät päls som är mer framträdande under vissa tider på året. Sådana områden bör inte användas för testning.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

9. Djuren ska inhysas individuellt. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 20°C ($\pm$ 3°C) för kaniner. Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs då målet bör vara 50–60 %. Artificiell belysning bör användas, med en dygnsrytm på 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. Konventionellt laboratoriefoder kan användas för utfodringen, och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten.

TESTNINGSFÖRFARANDE

Applicering av testkemikalien

10. Testkemikalien appliceras på en liten yta (cirka 6 cm²) av huden och täcks med en kompress som hålls på plats med ett icke-irriterande häftförband. Om det inte är möjligt att applicera testkemikalien direkt (exempelvis vätskor eller vissa pastor) bör den först appliceras på kompressen, som därefter placeras på huden. Kompressen ska under exponeringsperioden hållas i lös kontakt med huden med hjälp av ett lämpligt halvocklusivt förband. Om testkemikalien appliceras på kompressen bör denna fästas på huden på ett sätt som säkerställer god kontakt och en jämn fördelning av kemikalien på huden. Man bör se till att djuret inte når kompressen eller kan äta eller andas in testkemikalien.
11. Flytande testkemikalier används vanligen utspädda. Vid testning av fasta ämnen (som vid behov kan pulveriseras) ska testkemikalien vätas med minsta möjliga mängd vatten (eller vid behov någon annan lämplig vehikel) som behövs för att säkerställa god hudkontakt. Om annan vehikel än vatten används bör vehikelns potentiella inverkan på den hudirritation som testkemikalien framkallar vara minimal eller noll.
12. I slutet av exponeringsperioden (som i regel varar fyra timmar) ska rester av testkemikalien om möjligt avlägsnas med vatten eller ett lämpligt lösningsmedel, utan att störa befintlig respons eller skada huden.

Doseringsnivå

13. En dos på 0,5 ml vätska eller 0,5 g fast ämne eller pasta appliceras på huden.

Inledande test (test avseende hudirritation/hudkorrosion in vivo på ett enskilt djur)

14. Om en testkemikalie bedömts vara frätande eller irriterande eller inte går att klassificera efter en WeO-analys eller en tidigare in vitro-testning är ytterligare in vivo-testning i regel inte nödvändig. I fall där man bedömer att det krävs ytterligare data ska in vivo-testet utföras först, med användning av ett djur och i enlighet med följande förfarande. Upp till tre testkompresser appliceras sekventiellt på djuret. Den första kompressen tas bort efter tre minuter. Om ingen allvarlig hudreaktion kan observeras appliceras en andra kompress, som i sin tur tas bort efter en timme. Om observationerna i detta skede tyder på att exponeringen kan förlängas till fyra timmar utan lidande för testdjuret, appliceras en tredje kompress, som tas bort efter fyra timmar. Därefter kan responsen graderas.
15. Om korrosion kan observeras efter någon av de tre sekventiella exponeringarna avslutas testet omedelbart. Om ingen korrosion observeras efter att den sista kompressen har tagits bort, hålls djuret under observation i 14 dagar, utom om korrosion framkallas tidigare.
16. I fall där testkemikalien inte förväntas framkalla korrosion men där den kan vara irriterande, appliceras en enstaka kompress på ett djur i fyra timmar.

Bekräftande test (in vivo-test avseende hudirritation med ytterligare djur)

17. Om ingen korrosion observeras vid det inledande testet bör irritationsrespons eller negativ respons bekräftas med hjälp av ytterligare två djur. En kompress appliceras på vardera djuret för en exponeringsperiod på fyra timmar. Om irritation har observerats vid det inledande testet kan det bekräftande testet göras sekventiellt eller genom samtidig exponering av ytterligare två djur. Om inledande test i undantagsfall inte utförs, kan två eller tre djur behandlas med en enskild kompress som tas bort efter fyra timmar. Om två djur används, och samma respons observeras hos båda, behövs ingen ytterligare testning. I annat fall testas även det tredje djuret. Responser som inte är entydiga kan behöva bedömas med användning av ytterligare djur.

Observationsperiod

18. Observationsperioden bör vara tillräckligt lång för att man till fullo ska kunna utvärdera om de observerade effekterna är reversibla eller inte. Försöket bör dock avslutas omedelbart om ett djur uppvisar ihållande tecken på svår smärta eller lidande. För utvärderingen av om verkningarna är reversibla bör djuren observeras i upp till 14 dagar efter att kompresserna har tagits bort. Om reversibilitet kan observeras innan 14 dagar har gått kan försöket omedelbart avslutas.

Kliniska observationer och gradering av hudreaktionerna

19. Alla djur bör undersökas för tecken på erytem och ödem, och den respons som erhållits vid 60 minuter och därefter vid 24, 48 och 72 timmar efter borttagning av kompresserna registreras. Vid inledande test på ett enskilt djur undersöks applikationsstället omedelbart efter att kompressen har tagits bort. Hudreaktionerna graderas och registreras enligt klassificeringsskalan i tabellen nedan. Om det uppkommit en hudskada som efter 72 timmar inte kan identifieras som irritation eller korrosion kan det krävas observationer fram till dag 14 för att avgöra om effekterna är reversibla. Utöver observationerna av irritation bör alla lokala toxiska effekter, t.ex. avfettning av huden, och alla skadliga systemiska effekter (t.ex. kliniska tecken på toxicitet eller effekter på kroppsvikten) till fullo beskrivas och registreras. I fall av tvetydig respons bör en histopatologisk undersökning övervägas i klargörande syfte.
20. Graderingen av hudresponser är alltid subjektiv. För att underlätta harmonisering i fråga om graderingen av hudresponser och som stöd för testningslaboratorier och för de personer som utför och tolkar observationer, måste den personal som utför observationerna få adekvat utbildning i det poängsättningssystem som används (se tabellen nedan). En illustrerad vägledning för gradering av hudirritation och andra skador kan vara till hjälp (3).

DATA OCH RAPPORTERING

21. Resultaten bör summeras i tabellform i den slutliga testrapporten, och de bör omfatta alla aspekter som anges i punkt 24.

Utvärdering av resultaten

22. Graderna av hudirritation bör bedömas med hänsyn till skadornas natur och allvarlighetsgrad samt till om skadorna är reversibla eller irreversibla. Individuella klassificeringsresultat utgör ingen absolut standard för ett materials förmåga att framkalla irritation, eftersom även andra effekter av testmaterialet utvärderas. De enskilda bedömningarna bör däremot ses som referensvärden, som bör utvärderas i kombination med alla andra observationer från undersökningen.
23. Reversibiliteten hos hudskador bör beaktas när man utvärderar respons med avseende på irriterande egenskaper. Om verkningar av typen alopeci (begränsat område), hyperkeratos, hyperplasi och flagnings håller i sig i slutet av den 14 dagar långa observationsperioden, bör testkemikalien betraktas som irriterande.

Testrapport

24. Testrapporten ska innehålla följande uppgifter:

Motivering för in vivo-testning:

- *weight-of-evidence-analys* av tidigare tillgängliga data, inbegripet resultat från stegvis testning enligt den rekommenderade strategin, enligt följande:
- Beskrivning av relevanta data som erhållits före testningen.
- Data som erhållits från de enskilda stegen i testningsstrategin.
- Beskrivning av utförda in vitro-tester, inklusive uppgifter om förfaranden samt resultat som erhållits med test- och referensämnen.
- WeO-analys för utförande av in vivo-försök.

Testkemikalie:

- Monokomponentämne: kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.
- UVCB-ämnen är ämnen med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiskt material: Dessa karakteriseras så långt som möjligt genom kemisk beteckning (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.
- Fysikaliskt tillstånd, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.
- Ursprung, satsnummer om sådant finns.
- Eventuell behandling av testkemikalien/kontrollämnet före testning (t.ex. uppvärmning, malning).

- Testkemikaliens stabilitet, sista förbrukningsdatum eller sista datum för upprepad analys, om känt.
- Lagringsförhållanden.

Vehikel:

- Identifieringsdata, koncentration (om tillämpligt), volym som har använts.
- Motivering för val av vehikel.

Försöksdjur:

- Art och stam som har använts, motivering om albinokanin inte har använts.
- Antalet djur per kön.
- De enskilda djurens vikt vid testets start och slut.
- Djurens ålder vid testets start.
- Ursprung, förvaringsförhållanden, foder och dylikt.

Testbetingelser:

- Metod för förberedelse av kompressområde.
- Uppgifter om använt kompressmaterial och kompressmetod.
- Uppgifter om testkemikaliens beredning, applicering och borttagning.

Resultat:

- En tabell med graderad irritations-/korrosionsrespons för varje djur vid samtliga observationspunkter.
- Beskrivningar av alla observerade skador.
- Beskrivande redogörelse av typen och graden av den irritation eller korrosion som observerats samt eventuella histopatologiska fynd.
- Beskrivning av andra skadliga lokala (till exempel avfettning av huden) och systemiska verkningar utöver hudirritation eller hudkorrosion.

Diskussion av resultaten

Slutsatser

LITTERATUR

- (1) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 203, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, undertecknat vid det 28:e mötet mellan kemikaliekommittén och kemikaliearbetsgruppen i november 1998.
- (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 Publications, Series on Testing and Assessment nr 19, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

TABELL: GRADERING AV HUDREAKTIONER

Rodnad och sårskorpebildning

Ingen rodnad.....	0
Svag rodnad (knappt skönjbart).....	1
Väldefinierad rodnad.....	2
Måttlig till svår rodnad.....	3
Svår rodnad (köttnad) till sårskorpebildning som förhindrar gradering av rodnaden...	4
Högsta möjliga poäng: 4	

Ödembildning

Inget ödem.....	0
Svagt ödem (knappt skönjbart).....	1
Milt ödem (området är väl avgränsat genom klar svullnad).....	2
Måttligt ödem (svullnadens höjd cirka 1 mm).....	3
Svårt ödem (höjd över 1 mm och svullnaden sträcker sig utöver exponeringsområdet)....	4
Högsta möjliga poäng: 4	

I fall av tvetydig respons kan en histopatologisk undersökning utföras i klargörande syfte.

Tillägg

DEFINITIONER

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Hudirritation: en reversibel hudskada som finns kvar i upp till fyra timmar efter applicering av en testkemikalie.

Hudkorrosion: en irreversibel skada på huden i form av synlig nekros genom epidermis och in i dermis, efter applicering av en testkemikalie i upp till fyra timmar. Typiska korrosiva reaktioner är sår, blödningar och blodiga sårskorpor samt, i slutet av observationsperioden på 14 dagar, missfärgning av huden på grund av blekning, partier med totalt håravfall och ärr. Histopatologi bör övervägas för att bedöma tveksamma skador.

Testkemikalie: varje ämne eller blandning som testas med denna testmetod.”

2) I del B ska kapitel B.17 ersättas med följande:

”B.17 TESTER AV GENMUTATIONER HOS DÄGGDJURSCELLER IN VITRO MED ANVÄNDNING AV HPRT- OCH XPRT-GENER

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinjer (TG) 476 (2016). Testmetoder ses regelbundet över med avseende på den vetenskapliga utvecklingen, nya bestämmelser samt djurens välbefinnande. Denna nya omarbetade version av TM B.17 speglar nästan trettio års erfarenhet av detta test och är också resultatet av utvecklingen av en ny och separat metod för in vitro-tester avseende genmutation hos däggdjursceller med användning av thymidinkinasgenen. TM B.17 ingår i en serie av testmetoder för genetisk toxikologi. Ett OECD-dokument som ger kortfattad information om tester inom genetisk toxikologi och en översikt över de senaste ändringarna av dessa testriktlinjer har utarbetats (1).
2. Syftet med genmutationstestet för däggdjursceller in vitro är att upptäcka genmutationer som inducerats av kemikalier. De cellinjer som används i dessa tester mäter framåtmutationer i rapportgener, i detta fall genen för endogent hypoxantin-guanin-fosforibosyltransferas (Hprt i gnagarceller, HPRT i mänskliga celler, vilka i den här testmetoden går under den samlade benämningen Hprt-genen och HPRT-testet) samt xantin-guanin-fosforibosyltransferas-transgenen (gpt) (här kallat XPRT-testet). Mutationstesterna HPRT och XPRT används för att påvisa olika spektra av genetiska händelser. Utöver de mutationshändelser som påvisas genom HPRT-testet (t.ex. punktmutationer, läsramsmutationer, små deletioner och insertioner) kan gpt-transgenens autosomala läge göra det möjligt att påvisa mutationer som uppstår på grund av stora deletioner och möjligen mitotisk rekombination som inte påvisas genom HPRT-testet eftersom Hprt-genen är belägen på X-kromosomen (2) (3) (4) (5) (6) (7). XPRT-testet används för närvarande i mindre omfattning än HPRT-testet för lagstadgade ändamål.
3. Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

4. Tester som utförs in vitro kräver i allmänhet att en exogen källa för metabolisk aktivering används. Det exogena metaboliska aktiveringssystemet efterliknar inte helt förhållandena in vivo.
5. Åtgärder bör vidtas för att undvika förhållanden som leder till artefaktiska positiva resultat (dvs. möjlig interaktion med testsystemet) som inte orsakas av direkt interaktion mellan testkemikalierna och cellens genetiska material. Sådana förhållanden kan vara ändringar av pH eller osmolalitet (8) (9) (10), interaktion med mediets komponenter (11) (12) eller alltför hög cytotoxicitet (13). En cytotoxicitet som överskrider de rekommenderade

maxnivåerna för cytotoxicitet enligt definitionen i avsnitt 19 anses vara för hög för HPRT-test.

6. Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag.

TESTPRINCIP

7. Muterade celler som saknar Hprt-enzymaktivitet i HPRT-testet eller xpRT-enzymaktivitet i XPRT-testet är resistent mot de cytostatiska effekterna av purinanalogen 6-tioguanin (TG). Celler som klarar av Hprt (i HPRT-testet) eller gpt (i XPRT-testet) är känsliga för TG eftersom TG ger upphov till inhibering av cellmetabolismen och stoppar fortsatt celledeling. Muterade celler kan därför föröka sig i närvaro av TG, till skillnad från normala celler som innehåller Hprt-enzym (i HPRT-testet) eller gpt-enzym (i XPRT-testet).
8. Celler i odlingar i form av suspensioner eller monolager exponeras för testkemikalien, både med och utan en exogen källa för metabolisk aktivering (se punkt 14), under en lämplig tidsperiod (3–6 timmar) och subkultiveras sedan för att bestämma cytotoxiciteten och möjliggöra fenotypisk expression innan mutanturvalet sker (14) (15) (16) (17). Cytotoxiciteten bestäms utifrån överlevandekvoten (RS), dvs. kloningseffektiviteten som mäts omedelbart efter behandling och anpassas efter eventuell cellförlust under behandlingen till skillnad från vid en negativ kontroll (punkt 18 och tillägg 2). De behandlade odlingarna bibehålls i ett tillväxtmedium under en tillräckligt lång tid, karakteristisk för varje celltyp, för att tillåta i det närmaste optimal fenotypisk expression av inducerade mutationer (i regel under minst 7–9 dagar). Efter fenotypisk expression bestäms mutantfrekvensen genom inokulering av ett känt antal celler i ett medium som innehåller det selektiva ämnet för detektion av mutantkolonier, och i ett medium utan selektivt ämne för bestämning av kloningseffektiviteten (viabiliteten). Efter en lämplig inkubationstid räknas kolonierna. Mutantfrekvensen räknas fram utifrån antalet mutantkolonier korregerat för kloningseffektiviteten vid tidpunkten för mutanturvalet.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Beredningar

Celler

9. De celltyper som används för HPRT- och XPRT-testerna bör ha påvisad känslighet för kemiska mutagener, hög kloningseffektivitet, stabil karyotyp och stabil spontan mutantfrekvens. Bland de vanligast förekommande cellerna för HPRT-test innefattas CHO-, CHL- och V79-linjerna från kinesiska hamsterceller, L5178Y lymfomceller från mus och TK6-linjerna från lymfoblastoidceller från människa (18) (19). AS52-celler som

tagits från CHO-linjer och som innehåller gpt-transgenen (och vars Hprt-gen har eliminerats) används till XPRT-testet (20) (21). HPRT-testet kan inte utföras på AS52-celler eftersom hprt-genen har eliminerats. Om andra cellinjer används ska detta motiveras och godkännas.

10. Cellinjer bör rutinmässigt kontrolleras med avseende på det modala kromosomantalets stabilitet och frånvaro av mykoplasmakontamination (22) (23), och celler får inte användas om de är kontaminerade eller om det modala kromosomantalet har ändrats. Cellernas normala cellcykeltid som används i testlaboratoriet bör fastställas och bör överensstämma med kända cellegenskaper. Den spontana mutantfrekvensen i stamodlingen bör också kontrolleras, och odlingen bör inte användas om mutantfrekvensen inte är acceptabel.
11. Innan odlingarna används i detta test kan de behöva rensas på befintliga muterade celler, t.ex. genom att odlas i HAT-medium för HPRT-testet och MPA-medium för XPRT-testet (5) (24) (se tillägg 1). De rensade odlingarna kan frysas ner och sedan tinas upp och användas som arbetslösningar med celler. De nyupptinade arbetslösningarna med celler kan användas för testet efter att normal dubbleringstid har uppnåtts. Vid genomförande av ett XPRT-test med rutinodling av AS52-celler bör detta göras under förhållanden som garanterar att gpt-transgenen bevaras (20).

Medier och odlingsbetingelser

12. Lämpliga odlingsmedier och inkubationsförhållanden (odlingskärl, fuktad atmosfär med 5 % CO₂ och inkubationstemperatur på 37 °C) bör väljas för odlingarna. Celler bör alltid odlas under förhållanden som garanterar en logfastillväxt. Det är särskilt viktigt att odlingsmedier och -förhållanden väljs så att man säkrar optimal celltillväxt under expressionsperioden och optimal kloningseffektivitet för både muterade celler och icke-muterade celler.

Beredning av odlingarna

13. Cellinjer dras upp från stamodlingar och inokuleras i odlingsmedium med en sådan densitet att cellerna i suspension eller i monolager fortsätter att växa exponentiellt under behandlings- och expressionsperioderna (konfluens bör undvikas för celler som växer i monolager).

Metabolisk aktivering

14. Exogena metaboliserande system bör användas när cellerna inte har tillräcklig endogen metabolisk kapacitet. Det mest använda systemet, som rekommenderas som standard om inte annat kan motiveras, är en kofaktorstödd postmitokondriell fraktion (S9) som beretts av lever från gnagare (vanligen råttor) som behandlats med enzyminducerande ämnen, t.ex. aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) eller en kombination av fenobarbital och β -naftoflavon (29) (30) (31) (32). Den senare kombinationen bryter inte mot Stockholmskonventionen om långlivade organiska föroreningar (33) och har visat sig vara lika effektiv som aroclor

1254 när det gäller att inducera multifunktionsoxidaser ("mixed-function oxidases") (29) (31). S9-fraktionen används vanligen i koncentrationer mellan 1–2 volymprocent men kan ökas till 10 volymprocent i det slutliga testmediet. Valet av typ och koncentration av använt exogent metaboliskt aktiveringssystem eller metabolisk induktion kan påverkas av den kemikalieklass som testas (34) (35) (36).

Beredning av testkemikalien

15. Fasta testkemikalier bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och vid behov spädas ut innan cellerna behandlas (se punkt 16). Flytande testkemikalier kan tillsättas direkt till testsystemet och/eller spädas ut före behandling av testsystemet. Gaser eller flyktiga testkemikalier bör testas genom lämpliga modifikationer av standardprotokollen, såsom behandling i slutna odlingskärl (37) (38). Testkemikalien bör beredas strax före behandling om inte stabilitetsdata visar att lagringen är acceptabel.

TESTBETINGELSER

Lösningsmedel

16. Man bör välja ett lösningsmedel som optimerar testkemikaliens löslighet utan att testet påverkas negativt, t.ex. genom förändringar i celltillväxten, påverkan på testkemikaliens integritet, reaktion med odlingskärlen eller försämrade metabolisk aktivering. När det är möjligt rekommenderas att man i första hand överväger vattenbaserade lösningsmedel (eller odlingsmedier). Vedertagna lösningsmedel är till exempel vatten och dimetylsulfoxid. Generellt bör organiska lösningsmedel inte överstiga 1 volymprocent, och vattenbaserade lösningsmedel (saltlösningar eller vatten) inte överstiga 10 volymprocent i det slutliga behandlingsmediet. Om man använder lösningsmedel som inte är vedertagna (t.ex. etanol eller aceton) bör detta stödjas av uppgifter om att de är kompatibla med testkemikalierna och testsystemet och att de inte är genotoxiska vid den koncentration som används. Om ett sådant underlag saknas är det viktigt att inkludera obehandlade kontroller (se tillägg 1) som påvisar att inga skadliga eller klastogeniska effekter induceras av det valda lösningsmedlet.

Mätning av cellproliferation och cytotoxicitet och val av exponeringskoncentrationer

17. Vid bestämning av maximal testkemikaliekoncentration bör man undvika koncentrationer som kan ge artefaktiska positiva resultat, t.ex. sådana som medför alltför kraftig cytotoxicitet (se punkt 20), fällning i odlingsmediet (se punkt 21) eller betydande ändringar av pH eller osmolalitet (se punkt 5). Om testkemikalien orsakar en betydande ändring av mediets pH vid tillsättningen kan pH justeras genom buffring av det slutliga behandlingsmediet för att undvika artefaktiska positiva resultat och upprätthålla lämpliga odlingsförhållanden.

18. Valet av koncentrationer baseras på cytotoxicitet och andra överväganden (se punkterna 20–22). Även om det kan vara användbart att utvärdera cytotoxicitet i ett inledande test för att bättre definiera de koncentrationer som ska användas i huvudförsöket är ett inledande test inte obligatoriskt. Även om en inledande cytotoxicitetsbedömning görs måste cytotoxiciteten för varje odling mätas i huvudexperimentet. Cytotoxicitet bör bedömas genom användning av RS, dvs. kloningseffektivitet (CE) hos celler som överförs till plattor omedelbart efter behandling, och justeras för eventuell cellförlust under behandlingen, utifrån en cellräkning, i förhållande till den justerade kloningseffektiviteten i negativa kontroller (där överlevandekvoten sätts till 100 %) (se tillägg 2 för formeln).
19. Minst fyra testkoncentrationer (exklusive lösningsmedel och positiva kontroller) som uppfyller acceptanskriterierna (lämplig cytotoxicitet, antal celler osv.) bör utvärderas. Även om användning av duplikat är att föredra kan både replikat och enskilt behandlade odlingar användas för varje koncentration som testas. De resultat som erhöles i de oberoende replikatodlingarna vid en given koncentration kan slås ihop för dataanalysen (17). För testkemikalier med låg eller ingen cytotoxicitet är två- till trefaldiga koncentrationsintervall vanligen lämpliga. Om testkemikalien är cytotoxisk bör de valda testkoncentrationerna täcka ett relevant intervall av cytotoxicitet och omfatta koncentrationer med måttlig, låg eller ingen cytotoxicitet. Många testkemikalier uppvisar koncentrationsreponskurvor. För att täcka in alla grader av cytotoxicitet eller undersöka dos-responsförhållandet i detalj kan det vara nödvändigt att använda mer nära varandra liggande koncentrationer och fler än fyra koncentrationer, i synnerhet i situationer där försöket måste upprepas (se punkt 43). Användning av mer än fyra koncentrationer kan vara särskilt viktigt vid användande av enstaka odlingar.
20. Om maxkoncentrationen ska baseras på cytotoxicitet bör den högsta koncentrationen ha ett RS-värde på mellan 20 och 10 %. Vid tolkning av positiva resultat som endast uppvisar ett RS-värde på 10 % eller lägre uppmanas till försiktighet (punkt 43).
21. För svårlösliga testkemikalier som inte är cytotoxiska vid koncentrationer under den lägsta olösliga koncentrationen bör den högsta analyserade koncentrationen framkalla grumlighet eller en fällning som är synlig med blotta ögat eller med hjälp av ett inverterat mikroskop vid slutet av behandlingen med testkemikalien. Även om cytotoxicitet uppträder över den lägsta olösliga koncentrationen är det lämpligt att testa endast en koncentration som orsakar grumlighet eller synlig fällning, eftersom fällningen kan ge artefaktiska effekter. När det gäller koncentrationer som ger fällningar bör man se till att fällningarna inte påverkar utförandet av testet negativt. Bestämning av löslighet i odlingsmediet före försöket kan vara användbart.
22. Om ingen fällning eller begränsande cytotoxicitet observeras ska de maximala testkoncentrationerna motsvara det lägsta av följande värden: 10 mM, 2 mg/ml eller 2 µl/ml (39) (40). Om testkemikalien inte har en definierad sammansättning, t.ex. ett ämne med okänd eller variabel sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiska

material (dvs. UVCB) (41), miljöextrakt osv., kan man behöva använda en högre toppkoncentration (t.ex. 5 mg/ml) om cytotoxiciteten inte är tillräckligt hög, så att koncentrationen av varje komponent ökas. Det bör dock noteras att dessa krav kan skilja sig för humanläkemedel (42).

Kontroller

23. Parallella negativa kontroller (se punkt 16), bestående av enbart lösningsmedel i behandlingsmediet och hanterade på samma sätt som behandlingsodlingarna, bör inkluderas för alla testbetingelser.
24. Parallella positiva kontroller behövs för att visa laboratoriets förmåga att identifiera mutagener enligt villkoren i det använda testprotokollet och, i förekommande fall, effektiviteten hos det exogena systemet för metabolisk aktivering. Exempel på positiva kontroller ges i tabell 1 nedan. Alternativa positiva kontrollämnen kan användas om det är motiverat. Eftersom in vitro-tester för genotoxicitet på däggdjursceller är tillräckligt standardiserade kan tester som använder sig av behandling med eller utan exogen metabolisk aktivering utföras med endast en positiv kontroll för metabolisk aktivering. I detta fall visar en enda klastogenisk positiv kontrollrespons både aktiviteten hos det metaboliska aktiveringssystemet och testsystemets känslighet. Varje positiv kontroll bör användas för en eller flera koncentrationer som förväntas ge öknings över bakgrunden som går att reproducera och detektera. Syftet med detta är att visa testsystemets sensitivitet, och responsen får inte äventyras av cytotoxicitet som överskrider de gränser som anges i testmetoden (se punkt 20).

Tabell 1: Rekommenderade referensämnen för utvärdering av laboratoriets kompetens och för urval av positiva kontroller.

Betingelser för metabolisk aktivering	Lokus	Ämne och CAS-nr
Frånvaro av exogen metabolisk aktivering	<i>Hprt</i>	Etylmetansulfonat [CAS-nr 62-50-0] Etylnitrokarbamid [CAS-nr 759-73-9] 4-Nitroquinolin 1-oxid [CAS-nr 56-57-5]
	<i>xprt</i>	Streptonigrin [CAS-nr 3930-19-6] Mitomycin C [CAS-nr 50-07-7]
Närvaro av exogen metabolisk aktivering	<i>Hprt</i>	3-Metylkolantren [CAS-nr 56-49-5] 7,12-dimetylbenzantracen [CAS-nr 57-97-6] Benso[a]pyren [CAS-nr 50-32-8]
	<i>xprt</i>	Benso[a]pyren [CAS-nr 50-32-8]

FÖRFARANDE

Behandling med testkemikalien

25. Prolifererande celler behandlas med testkemikalien i såväl närvaro som frånvaro av ett system för metabolisk aktivering. Exponering bör ske under en lämplig tidsperiod (normalt är 3–6 timmar lagom).
26. Minimiantalet celler som används för varje testodling (kontrollodlingar och behandlade odlingar) i varje etapp i testet bör baseras på den spontana mutantfrekvensen. Enligt de allmänna anvisningarna ska ett tillräckligt stort antal celler behandlas och passera så att tio spontana mutanter kan bevaras i varje odling i testet (17). Den spontana mutantfrekvensen brukar ligga på mellan 5 och 20×10^{-6} . För att få fram en spontan mutantfrekvens på 5×10^{-6} och för att bevara ett tillräckligt stort antal spontana mutanter (10 eller fler) även i de odlingar som behandlats med koncentrationer som orsakar 90 % cytotoxicitet under behandlingen (10 % RS) är det nödvändigt att behandla minst 20×10^6 celler. Dessutom måste ett tillräckligt antal celler (aldrig färre än två miljoner) odlas fram under expressionsperioden och överförs till plattor för mutanturvalet (17).

Fenotypisk expressionstid och mätning av mutantfrekvens

27. Efter behandlingsperioden odlas cellerna på ett sätt som tillåter mutant fenotypisk expression. Det räcker i allmänhet med sju till nio dagar tills de nya inducerade Hprt- och xprt-mutanterna uppvisar en närmast optimal fenotypisk expression (43) (44). Under den här perioden subkultiveras cellerna regelbundet så att de fortsätter att tilläxa exponentiellt. Efter fenotypisk expression överförs cellerna till plattor igen i medier med respektive utan selektivt ämne (6-tioguanin) för bestämning av antal mutanter respektive kloningseffektivitet vid tidpunkten för urvalet. Denna överföring kan genomföras med användning av antingen plattor för odling i monolager eller mikrotiterplattor för celler i suspension. För mutanturvalet bör cellerna överförs till plattor vid en densitet som garanterar en optimal mutant återhämtning (dvs. så att metabolisk samverkan undviks) (17). Plattorna inkuberas under en lämplig tidsperiod som ger optimal kolonitillväxt (t.ex. 7–12 dagar) varefter kolonierna räknas. Mutantfrekvensen beräknas utifrån antalet mutantkolonier korregerat för kloningseffektiviteten vid tidpunkten för mutanturvalet (se tillägg 2 för formler).

Laboratoriets kompetens

28. För att visa att det finns tillräcklig erfarenhet av testet innan det börjar användas för rutintestning bör laboratoriet ha utfört en serie försök med positiva referensämnen som utövar sin verkan via olika mekanismer (minst ett aktivt ämne med och ett aktivt ämne utan metabolisk aktivering som valts ut bland ämnena i tabell 1) och olika negativa kontroller (med olika lösningsmedel/vehiklar). Dessa positiva och negativa kontrollresponser bör överensstämma med vad som anges i litteraturen. Detta gäller inte laboratorier som redan har erfarenhet, dvs. har en historisk databas enligt punkterna 30–33.

29. Ett urval av de positiva kontrollämnena (se tabell 1 i punkt 25) bör undersökas både vid avsaknad och förekomst av metabolisk aktivering, i syfte att visa deras förmåga att detektera mutagena kemikalier, för att avgöra det metaboliska aktiveringssystemets effektivitet och för visa att celltillväxtförhållandena har varit lämpliga under behandling, fenotypisk expression och mutanturval samt att lämplig metod för gradering använts. En serie koncentrationer av de valda ämnena bör användas för att ge reproducerbara och koncentrationsrelaterade ökningskurvor över bakgrunden i syfte att visa testsystemets sensitivitet och dynamiska omfång.

Historiska kontrolldata

30. Laboratoriet bör fastställa följande:

- Historiskt positivt kontrollintervall samt fördelning.
- Historiskt negativt (obehandlad, lösningsmedel) kontrollintervall samt fördelning.

31. Om data för en historiskt negativ kontrollfördelning samlas in först bör de parallella negativa kontrollerna överensstämma med publicerade kontrolldata (22). Allteftersom kontrollfördelningen kompletteras med fler försöksdata bör de parallella negativa kontrollerna helst ligga inom fördelningens kontrollgräns på 95 % (17) (45) (46).

32. Laboratoriets historiska databas för negativa kontroller bör inledningsvis baseras på minst 10 försök, men bör helst bygga på minst 20 försök som utförts under jämförbara testbetingelser. Laboratorierna bör använda kvalitetskontrollmetoder såsom kontrolldiagram (t.ex. C-diagram eller X-stapelldiagram (47)), för att fastställa hur variablerna deras positiva och negativa kontrolldata är och för att visa att metoden är ”under kontroll” (46). Fler rekommendationer om hur man bygger upp och använder historiska data (t.ex. kriterier för att ta med eller inte ta med data samt acceptanskriterier för ett givet försök) finns i litteraturen (45).

33. Negativa kontrolldata bör bestå av mutantfrekvenser från enskilda odlingar eller, ännu hellre, replikatodlingar enligt beskrivningen i punkt 23. Parallella negativa kontroller bör helst ligga inom kontrollgränsen på 95 % för fördelningen av laboratoriets historiska negativa kontrolldatabas (17) (45) (46). Om parallella negativa kontrolldata faller utanför kontrollgränserna på 95 % kan de ändå ingå i den historiska kontrollfördelningen så länge de inte är extremt avvikande och det finns bevis för att testsystemet är ”under kontroll” (se ovan) och att inga tekniska eller mänskliga fel begåtts.

34. Eventuella ändringar av försöksprotokollen bör övervägas när det gäller deras överensstämmelse med laboratoriets befintliga historiska kontrolldatabaser. Alla större inkonsekvenser bör leda till att en ny historisk kontrolldatabas upprättas.

DATA OCH RAPPORTERING

Presentation av resultaten

35. Presentationen av resultaten bör omfatta all den data som behövs för att beräkna cytotoxiciteten (uttryckt som ett RS-värde). Data för både behandlade odlingar och kontrollodlingar bör inkludera antalet celler vid behandlingens slut, antalet celler som överförts till plattor direkt efter behandling samt antal kolonier (eller antal brunnar utan kolonier för mikrotitermetoden). RS-värdet för varje odling ska uttryckas som en procentandel av den parallella lösningsmedelskontrollen (se tillägg 1 för definitioner).
36. Redovisningen av resultat bör även omfatta alla data som behövs för att beräkna mutantfrekvensen. Data för både behandlade odlingar och kontrollodlingar bör omfatta: 1) antalet celler som överförts till plattor med respektive utan selektivt ämne (i samband med att cellerna överförts till plattor för mutanturvalet), och 2) antalet räknade kolonier (eller, för mikrotitermetoden, antalet brunnar utan kolonier) från plattorna med respektive utan selektivt ämne. Mutantfrekvensen beräknas utifrån antalet mutantkolonier (i plattor med selektivt ämne) korrigerat för kloningseffektiviteten (från plattorna utan selektivt ämne). Mutantfrekvensen uttrycks som antalet muterade celler per miljon viabla celler (se tillägg 1 för definitioner).
37. Data bör anges per enskild odling. Dessutom bör alla data sammanfattas i tabellform.

Acceptanskriterier

38. Testet måste uppfylla följande kriterier för att godkännas:
- Den parallella negativa kontrollen måste anses godtagbar för registrering i laboratoriets historiska databas över negativa kontroller enligt punkt 33.
 - Parallella positiva kontroller (se punkt 24) bör framkalla reaktioner som överensstämmer med de kontroller som genereras i en historiska databasen över positiva kontroller och ge en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.
 - Två olika testbetingelser (med respektive utan metabolisk aktivering) testades, utom då en av dem gav positiva resultat (se punkt 25).
 - Tillräckligt många celler och koncentrationer finns tillgängliga för analys (punkterna 25, 26 och 19).
 - Urvalskriterierna för toppkoncentrationen överensstämmer med de kriterier som beskrivs i punkterna 20, 21 och 22.

Utvärdering och tolkning av resultaten

39. Förutsatt att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses en testkemikalie vara klart positiv om följande gäller för någon av de undersökta testbetingelserna:

- Åtminstone en av testkoncentrationerna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med samtidig negativ kontroll.
- Ökningen är dosrelaterad när den utvärderas med ett lämpligt trendtest.
- Något av resultaten ligger utanför fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserad 95 %-kontrollgräns, se punkt 33).

Om alla dessa kriterier är uppfyllda anses testkemikalien kunna inducera genmutationer hos odlade däggdjursceller i detta testsystem. Rekommendationer om de lämpligaste statistiska metoderna finns i litteraturen (46) (48).

40. Förutsatt att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses en testkemikalie vara klart negativ om följande gäller för samtliga undersökta testbetingelser:

- Ingen av testkoncentrationerna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.
- Det finns ingen koncentrationsrelaterad ökning vid utvärdering med ett lämpligt trendtest.
- Alla resultat ligger inom fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserad 95 %-kontrollgräns, se punkt 33).

Testkemikalien anses då inte kunna inducera genmutationer hos odlade däggdjursceller i detta testsystem.

41. Det finns inget krav på verifiering av ett tydligt positivt eller negativt svar.

42. Om responsen varken är klart negativ eller klart positiv enligt beskrivningen ovan eller för att göra det lättare att fastställa resultatets biologiska relevans bör uppgifterna fackgranskas och/eller undersökas ytterligare. Det kan även vara användbart att upprepa försöket med ändrade testbetingelser (t.ex. koncentrationsavstånd eller andra metaboliska aktiveringsvillkor, dvs. S9-koncentration eller S9-ursprung).

43. I sällsynta fall är det, trots ytterligare undersökningar, inte möjligt att dra en slutsats om huruvida testkemikalien ger positiva eller negativa resultat. Responsen på testkemikalien ska i sådana fall anses vara tvetydig (vilket innebär att den lika gärna kan vara positiv som negativ).

Testrapport

44. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

- Källa, satsnummer, sista förbrukningsdag om detta anges.
- Testkemikalies stabilitet i sig, om den är känd.
- Löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet, om detta är känt.

- Mätning av pH, osmolalitet och fällningar i det odlingsmedium till vilket testkemikalien tillsattes, i förekommande fall.

Monokomponentämne:

- fysikaliskt tillstånd, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,
- kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.

Multikomponentämne, UVCB-ämne och blandning:

- karakteriseras så långt som möjligt genom kemisk beteckning (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.

Lösningsmedel:

- Motivering av valet av lösningsmedel.
- Procentandelen lösningsmedel i den slutliga odlingsmediet.

Celler:

För stamodlingar i laboratorium:

- Typ, cellinjernas källa.
- Antal passager, om känt, och laboratoriets historia.
- Kromosomernas karyotypiska egenskaper och/eller modala antal.
- Metoder för underhåll av cellodlingar.
- Frånvaron av mykoplasma.
- Fördubblingstid.

Testbetingelser:

- Grund för val av koncentrationer och antal kulturer inklusive t.ex. cytotoxicitetsdata och löslighetsbegränsningar.
- Mediets sammansättning, CO₂-koncentration och fuktighetsnivå.
- Testkemikaliens koncentration, uttryckt som slutlig koncentration i odlingsmediet (t.ex. µg eller mg/ml eller mM av odlingsmediet).
- Koncentration (och/eller volym) av det lösningsmedel och den testkemikalie som tillsätts odlingsmediet.
- Inkubationstemperatur.
- Inkubationstid.

- Behandlingens varaktighet.
- Celldensitet under behandlingen.
- Typ och sammansättning hos det system som används för metabolisk aktivering (S9-källa, beredningsmetod för S9-blandningen, koncentration eller volym för S9-blandningen och S9 i det slutliga odlingsmediet, kvalitetskontroller av S9).
- Positiva och negativa kontrollämnen, slutkoncentrationer för varje behandlingsförhållande.
- Expressionsperiodens längd (inklusive antal celler som inokulerats samt subkulturer och scheman för näringstillförsel, om detta är tillämpligt).
- Det selektiva ämnets identitet och koncentration.
- Acceptanskriterier för testerna.
- Metoder som används för att räkna antalet viabla och muterade celler.
- Metoder för mätning av cytotoxicitet.
- All tilläggsinformation som är relevant rörande cytotoxicitet samt använd metod.
- Inkubationstidens varaktighet efter överföring till plattor.
- Kriterier för att bedöma om testresultaten är positiva, negativa eller tvetydiga.
- Metoder som använts för att bestämma pH, osmolalitet och fällningar.

Resultat:

- Antal behandlade celler och antal subkultiverade celler för varje odling.
- Mätning av cytotoxicitet och övriga observationer, i förekommande fall.
- Tecken på fällning och tid för bestämningen.
- Antal celler som överförts till plattor i selektiva och icke-selektiva medier.
- Antal kolonier i icke-selektiva medier och antal resistenta kolonier i selektiva medier, samt relaterade mutantfrekvenser.
- Koncentration-responsförhållande, där det är möjligt.
- Data om parallella negativa (lösningsmedel) och positiva kontroller (koncentrationer och lösningsmedel).
- Historiska negativa (lösningsmedel) och positiva kontrolldata med intervall, medelvärden, standardavvikelser och konfidensintervall (t.ex. 95 %) samt antal data.
- Statistik (för individuella odlingar och sparade replikat, i förekommande fall) samt p-värden om dessa finns.

Diskussion av resultaten.

Slutsats

LITTERATURHÄNVISNINGAR

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment Nr. 234, OECD, Paris.
- (2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- (3) Chu E.H.Y. och Malling H.V. (1968). Däggdjurscellers genetik. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Akad. Sci., USA, s. 61, 1306–1312.
- (4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. och Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. *Mutagen. Res.*, 4, 394-403.
- (5) Aaron C.S. and Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. *Mutation Res.*, 223, 121–128.
- (6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. and Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.*, s. 312, 235–239.
- (7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. och Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: En rapport om fas III i USA. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, s. 196, 17–36.
- (8) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. och Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. En rapport från ICPEMC:s arbetsgrupp nr 9. *Mutation Res.*, s. 257, 147–204.
- (9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. and Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, s. 268, 297–305.
- (10) Brusick, D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, *Miljö. Mutagen.*, s. 8, 789–886.
- (11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. och Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitritotriacetic Acid. *Miljö. Mol. Mutation Res.*, s. 49, 439–452.

- (12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. och Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, *Mutation Res.*, s. 634, 177–183.
- (13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., och Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. *Mutation Res.*, 584, 1–256.
- (14) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W.N, Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. and Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. *Mutation Res.*, 189, 135-141.
- (15) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. *Mutation Res.*, s. 216, 9–17.
- (16) Stankowski, L. F. Jr., Tindall K.R. and Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. *Mutation Res.*, 160, 133–147.
- (17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. and Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), Cambridge University Press, s. 66–101.
- (18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., och Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 86, 193-214.
- (19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, *Mutation Res.*, 85, 165-175.
- (20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2gpt-Transformed Cells, *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1411-1415.
- (21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., and Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. *Proc Natl Acad Sci.*, 83(24): 9616–9620.

- (22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manus under bearbetning).
- (23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. och Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, s. 33, 261–287.
- (24) Rosen M.P., San R.H.C. och Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. s. 8, 299–305.
- (25) Natarajan A.T., Bates A.D., Van Buul P.P.W., Meijers M. och de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., s. 37, 83–90.
- (26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. och Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., s. 46, 365–373.
- (27) Ames B.N., McCann J. och Yamasaki E. (1975). Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., s. 31, 347–364.
- (28) Maron, D.M. och Ames, B.N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Res., s. 113, 173–215.
- (29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. and Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen. 7, 175-177.
- (30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. and Sugimura T. (1976). Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. och Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. and Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. och Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. Pathol. Toxicol., 4, 55-65.

- (32) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. och Galloway, S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, s. 28, 51–59.
- (33) Unep (2001). Stockholmskonventionen om långlivade organiska föroreningar, FN:s miljöprogram (Unep). Tillgänglig på: [<http://www.pops.int.html>].
- (34) Tan E.-L. and Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cy Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. *Mutation Res.*, 84, 147-156.
- (35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Mammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. *Environ. Mol. Mutation.*, 4, 7-18.
- (36) Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. *Environ. Mol. Mutation*, s. 4, 7–18.
- (37) Krahn, D.F., Barsky, F.C. och McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT-muteringsförsök: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, s. 91–103.
- (38) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. och Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environ. Mutagen.*, 5, 795-801.
- (39) OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). Utgiven av Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD).
- (40) Brookmire L., Chen J.J. och Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, *Environ. Mol. Mutation*, s. 54, 36–43.
- (41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances.
- (42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals

Intended for Human Use. Tillgänglig på: [<https://federalregister.gov/a/2012-13774>].

- (43) O'Neill J.P. och Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguanine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), *Mutation, Res.*, 59, 109-118.
- (44) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., and Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. *Mutation Res.*, 1335:2, s. 121–28.
- (45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., and Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, *Mutation, Res.*, 723, 87-90.
- (46) OECD (2014). Statistik som stöd för revisionen av riktlinjerna för genotoxicitetsförsök. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 199, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., och Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (48) Fleiss J. L., Levin B., and Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Tillägg 1

DEFINITIONER

Mutagener som orsakar punktmutationer: kemikalier som orsakar utbyte av baspar i DNA.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Kloningseffektivitet: Procentandel celler som överförs till plattor vid låg densitet och som kan tillväxa till en koloni som kan räknas.

Koncentrationer: slutliga koncentrationer av testkemikalien i odlingsmediet.

Cytotoxicitet: För de analyser som omfattas av denna testmetod definieras cytotoxicitet som en minskning av den relativa överlevnaden hos behandlade celler jämfört med den negativa kontrollen (se särskild punkt).

Framåtmutation: en genmutation från den parentala typen till mutantformen, vilket ger upphov till en förändring eller förlust av den enzymatiska aktiviteten eller funktionen hos det protein som bildas.

Läsramsmutagener: kemikalier som orsakar addition eller deletion av ett eller flera baspar i DNA-molekylen.

Genotoxisk: en allmän term som omfattar alla typer av DNA- och kromosomskador, inklusive brott, addukter, omlagringar, mutationer, kromosomavvikelse och aneuploidi. Inte alla typer av genotoxiska effekter leder till mutationer eller stabila kromosomskador.

HAT-medium: ett medium som innehåller hypoxantin, aminopterin och tymidin och som används för att rensa Hp^rt-mutanter.

Mitotisk rekombination: rekombination mellan homologa kromatider under mitosen, vilket kan resultera i dubbla trådbrott i DNA eller förlust av heterozygositet.

MPA-medium: ett medium som innehåller xantin, adenin, tymidin, aminopterin och mykofenolsyra och som används för att rensa Xp^rt-mutanter.

Mutagent ämne: ämne som producerar en ärftlig ändring av DNA-basparsekvensen/-erna i gener eller i kromosomstrukturen (kromosomavvikelse).

Mutantfrekvens: antal mutantkolonier som observeras delat med antal celler som överförs till plattor i selektivt medium, korrigerat för kloningseffektivitet (eller viabilitet) vid tidpunkten för urvalet.

Fenotypisk expressionstid: den tid efter behandlingen under vilken den genetiska förändringen fixeras i genomet och de ursprungliga genprodukterna försvinner i så hög grad att den fenotypiska egenskapen förändras.

Relativ överlevnad (RS): RS används som ett mått på behandlingsrelaterad cytotoxicitet. RS är kloningseffektiviteten (CE) hos celler som överförs till plattor omedelbart efter behandling justerat för eventuell cellförlust under behandlingen, jämfört med kloningseffektiviteten i negativa kontroller (där överlevanden sätts till 100 %).

S9-leverfraktion: supernatant av leverhomogenat efter 9 000 g centrifugering, dvs. råleverextrakt.

S9-blandning: blandning av S9-leverfraktion och kofaktorer som krävs för metabolisk enzymaktivitet.

Lösningsmedelskontroll: Allmän term för att definiera kontrollodlingar som endast tillsatts det lösningsmedel som används för att lösa upp testkemikalien.

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

Obehandlad kontroll: odlingar som inte behandlas (dvs. varken testkemikalie eller lösningsmedel tillsätts), men som behandlas parallellt på samma sätt som de odlingar där testkemikalien tillsätts.

UVCB-ämnen: kemiska ämnen av okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter och biologiska material.

Tillägg 2

FORMLER FÖR BEDÖMNING AV CYTOTOXICITET OCH MUTANTFREKVENNS

Cytotoxicitet bedöms genom den relativa överlevnaden, dvs. kloningseffektiviteten hos celler som överförts till plattor omedelbart efter behandling justerat för eventuell cellförlust under behandlingen, jämfört med den justerade kloningseffektiviteten i negativa kontroller (där överlevanden sätts till 100 %) (se RS-formeln nedan).

Anpassad CE för en odling som behandlats med testkemikalie beräknas på följande sätt:

$$\text{Adjusted CE} = \frac{\text{Number of cells at the end of treatment}}{\text{Number of cells at the beginning of treatment}}$$

RS för en odling som behandlats med testkemikalie beräknas på följande sätt:

$$\text{RS} = \frac{\text{Adjusted CE in treated culture}}{\text{Adjusted CE in the solvent control}} \times 100$$

Mutantfrekvensen är kloningseffektiviteten hos mutantkolonier i ett selektivt medium delat med kloningseffektiviteten i ett icke-selektivt medium för samma odling vid tidpunkten för urvalet.

$$\text{Mutant frequency} = \frac{\text{Cloning efficiency of mutant colonies in selective medium}}{\text{Cloning efficiency in non – selective medium}}$$

När plattor används för kloningseffektivitet:

CE = antal kolonier/antal celler som överförts till plattor.

När mikrotiterplattor används för kloningseffektivitet:

Antalet kolonier per brunn i mikrotiterplattor följer en Poisson-fördelning.

Kloningseffektivitet = $-\text{LnP}(0)$ /antal celler som överförts per brunn.

$\text{LnP}(0)$ är det troliga antalet tomma brunnar av de inokulerade brunnarna och beskrivs av följande formel:

$\text{LnP}(0) = -\text{Ln}(\text{antal tomma brunnar/antal fyllda brunnar})$

3) I del B ska kapitel B.22 ersättas med följande:

”B.22 DOMINANT LETALT TEST PÅ GNAGARE

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 478 (2016). Testmetoder ses regelbundet över mot bakgrund av den vetenskapliga utvecklingen, nya bestämmelser samt djurens välbefinnande. Den modifierade versionen av den här testmetoden återspeglar över trettio års erfarenhet av testet och möjligheten att integrera eller kombinera testet med andra toxicitetstester, t.ex. studier som avser utveckling, reproduktionstoxicitet eller genotoxicitet. På grund av sina begränsningar och det stora antalet djur som används är testet dock inte avsett att användas som en primärmetod utan snarare som en kompletterande testmetod som endast ska användas när de befintliga kraven inte går att uppfylla på annat sätt. Genom att kombinera olika toxicitetstester kan antalet försöksdjur som behövs för toxicitetstesterna minskas kraftigt. Ett OECD-dokument som ger kortfattad information om tester inom genetisk toxikologi och en översikt över de senaste ändringarna av dessa testriktlinjer har utarbetats (1).
2. Syftet med det dominanta letala testet (DL-försöket) är att undersöka om kemikalier producerar mutationer i form av kromosomavvikelser i könsceller. Det dominanta letala testet är även relevant för att bedöma genotoxicitet, eftersom faktorer som in vivo-metabolism, farmakokinetik och DNA-reparationsprocesser är aktiva och bidrar till responsen, även om de kan variera mellan arter. Induktion av DL-mutation efter kontakt med en testkemikalie tyder på att kemikalien har påverkat könsvävnaden hos försöksdjuret.
3. DL-mutationer dödar embryon och foster. Induktion av DL-mutation efter exponering för en testkemikalie tyder på att kemikalien har påverkat försöksdjurets könsceller.
4. Ett DL-test är användbart för att bekräfta positiva resultat från tester med somatiska in vivo-endpoints, och det är en relevant endpoint för att förutsäga faror för människor samt risk för genetiska sjukdomar som överförs via könscellerna. Detta test kräver dock ett stort antal försöksdjur och mycket arbete och är därför väldigt kostsamt och tidskrävande. Eftersom den spontana frekvensen för dominant letala mutationer är relativt hög har testet i regel begränsad känslighet för att påvisa små ökningar av mutationsfrekvensen.
5. Definitioner av centrala begrepp anges i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

6. Testet utförs oftast på möss (2) (3) (4), men andra arter, t.ex. råtta (5) (6) (7) (8), kan vara lämpliga i vissa fall om det kan motiveras vetenskapligt. DL orsakas i regel av stora kromosomavvikelser (strukturella och numeriska avvikelser) (9) (10) (11), men genmutation kan inte uteslutas. En DL-mutation är en mutation som sker i själva könscellen eller som fixeras efter befruktning i det tidiga embryot och som inte skadar könscellens funktion, men som är dödlig för det befruktade ägget eller för embryot som håller på att utvecklas.
7. Individuella hanar paras ihop sekventiellt med icke tidigare befruktade honor under lämpliga intervall. Antalet parningar efter behandling beror på det slutliga syftet med DL-försöket (punkt 23), och samtliga faser i hanens könscellsmognad ska utvärderas inför försöket (12).
8. Om det finns bevis för att testkemikalien eller dess metabolit(er) inte kommer att nå testiklarna är det inte lämpligt att använda testet.

TESTPRINCIP

9. Hanar exponeras i regel för testkemikalien på ett lämpligt sätt och paras därefter med obehandlade honor som inte har befruktats tidigare. Könscellernas olika stadier kan undersökas separat genom att använda på varandra följande parningsperioder. Efter parning avlivs honorna efter en lämplig tidsperiod, och deras livmödrar undersöks för att bestämma antal implantat samt levande och döda embryon. Testkemikaliens dominanta letalitet bestäms genom att antalet levande implantat per hona i den behandlade gruppen jämförs med antalet levande implantat per hona i gruppen med vehikel-/lösningsmedelskontroll. Ökningen av antalet döda implantat per hona i den behandlade gruppen i förhållande till antalet döda implantat per hona i kontrollgruppen återspeglar den postimplantationsförlust som testkemikalien inducerat. Postimplantationsförlusten beräknas genom dödskvoten bland det totala antalet implantat i den behandlade gruppen i förhållande till dödskvoten bland det totala antalet implantat i kontrollgruppen. Den letala verkan före implantation kan uppskattas genom att beräkna skillnaden mellan antalet gulkroppar och det totala antalet implantat eller genom det totala antalet implantat per hona i behandlade grupper och kontrollgrupper.

KVALIFIKATIONSPRÖVNING AV LABORATORIET

10. För det här försöket bör laboratoriets kompetens fastställas genom förmågan att reproducera dominanta letala frekvenser utifrån tidigare publicerade data (t.ex. (13) (14) (15) (16) (17) (18)) med positiva kontrollämnen (inklusive svaga responser), t.ex. de som listas i tabell 1, och vehikelkontroller samt erhålla negativa kontrollfrekvenser som överensstämmer med de acceptabla gränserna (se referenser ovan) eller med laboratoriets historiska kontrollfördelning, om sådan finns.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Beredningar

Val av djurart

11. Friska vuxna djur som härrör från normala laboratoriestammar bör användas. Oftast används möss, men även råttor kan vara lämpliga. Andra lämpliga däggdjursarter kan användas om en vetenskaplig motivering anges i rapporten.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

12. För gnagare bör temperaturen i djurutrymmena vara 22 °C (± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör helst vara 50–60 %, men minst 40 %, och bör helst inte överstiga 70 % utom när rummet rengörs. Artificiell belysning bör användas, med en dygnsrytm på 12 timmar ljus följt av 12 timmar mörker. För utfodring kan konventionellt laboriefoder användas med obegränsad tillgång till dricksvatten. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie när den administreras genom denna väg. Gnagare bör före behandling eller parning inhysas i små grupper (högst fem individer) med individer av samma kön, förutsatt att inget aggressivt beteende observeras eller förväntas, och företrädesvis i fasta burar med lämplig miljöberikning. Djuren får hållas individuellt om det är vetenskapligt motiverat.

Förberedelse av djuren

13. Friska könsmogna hanar och honor väljs ut slumpvis till kontroll- och behandlingsgrupperna. Djuren ska ha en unik identifiering som appliceras med en human och minimalt invasiv metod (t.ex. ringmärkning, taggar, mikrochipp eller biometrisk identifiering, men inte öron- eller tassclips). De bör vänjas vid förhållandena i laboratoriet under minst fem dagar. Burarna placeras på sådant sätt att eventuella verkningar på grund av placeringen minimeras. Korskontaminering av den positiva kontrollen och testkemikalien bör undvikas. När undersökningen ska påbörjas är det lämpligt att viktskillnaden mellan djuren är så liten som möjligt, och den bör inte överstiga ± 20 % av medelvikten för varje kön.

Beredning av doser

14. Fasta testkemikalier bör lösas upp eller suspenderas i lämpliga lösningsmedel eller vehiklar eller blandas i foder eller dricksvatten innan dosen administreras till djuren. Testkemikalier i flytande form kan doseras direkt eller spädas ut före doseringen. Vid inhalationsexponering kan testkemikalier administreras såsom gas, ånga eller en fast/flytande aerosol, beroende på deras fysikalisk-kemiska egenskaper. Nygjorda beredningar av testkemikalien bör användas om inte stabilitetsdata visar att lagringen är acceptabel och lämpliga lagringsförhållanden bör fastställas.

Testbetingelser

Lösningsmedel/vehikel

15. Lösningsmedlet/vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testkemikalien. Om andra lösningsmedel/vehiklar än de gängse används bör det finnas referensdata som visar att de är kompatibla. När det är möjligt, rekommenderas att man i första hand överväger vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar. Exempel på vanliga kompatibla lösningsmedel/vehiklar är vatten, fysiologisk saltlösning, metylcellulosalösning, karboximetylcellulosa natriumsaltlösning, olivolja och majsolja.

Positiva kontroller

16. Parallella positiva kontrolldjur bör alltid användas såvida inte laboratoriet har påvisat sin duglighet för testet i fråga och utfört testet rutinmässigt under de senaste åren (t.ex. under de senaste 5 åren). Det är dock inte nödvändigt att behandla de positiva kontrolldjuren på samma sätt som de djur som behandlas med testkemikalien, eller att ta prover på samtliga parningsintervall. De positiva kontrollämnena ska ha en känd dominant letal verkan under de förhållanden som gäller för testet. Utom vid behandling bör försöksdjuren i kontrollgrupperna hanteras på ett sätt som är identiskt med det sätt som försöksdjuren i de behandlade grupperna hanteras på.
17. Doserna av de positiva kontrollämnena bör väljas så att de ger svaga eller måttliga effekter som kritiskt bedömer resultaten och analysens känslighet, men som konsekvent ger positiva dominanta letala effekter. Exempel på positiva kontrollämnen och lämpliga doser ges i tabell 1.

Tabell 1: Exempel på positiva kontrollämnena.

Ämne [CAS-nr] (Referensnummer)	Effektiv dosering) (mg/kg) (arter av gnagare)	Administrering stid (dagar)
Trietylenmelamin [51-18-3] (15)	0,25 (möss)	1
Cyklofosfamid [50-18-0] (19)	50–150 (möss)	5
Cyklofosfamid [50-18-0] (5)	25–100 (råttor)	1
Etylmetansulfonat [62-50-0] (13)	100–300 (möss)	5
Monomerisk akrylamid [79-06-1] (17)	50 (möss)	5
klorambucil [305-03-3] (14)	25 (möss)	1

Negativa kontroller

18. Negativa kontroller, behandlade med lösningsmedel eller endast vehikel, och i övrigt behandlade på samma sätt som djuren i behandlingsgrupperna, bör inkluderas för varje

provtagningstillfälle (20). I avsaknad av historiska eller publicerade kontrollerdata som visar att ingen dominant letalitet eller andra deletära effekter induceras av det valda lösningsmedlet/vehiklen, bör obehandlade kontroller också inkluderas för varje provtagningstillfälle, för att fastställa acceptansen för vehikelkontrollen.

FÖRFARANDE

Antal försöksdjur

19. Enskilda hanar paras sekventiellt med lämpliga förbestämda intervall (t.ex. veckovis, se punkterna 21 och 23), företrädesvis med en icke tidigare befruktad hona. Antalet hanar per grupp bör bestämmas i förväg så att det är tillräckligt stort (i kombination med antalet parade honor vid varje parningsintervall) för att man ska uppnå den statistiska styrka som krävs för att upptäcka åtminstone en fördubbling i DL-frekvensen (punkt 44).
20. Antalet honor per parningsintervall bör också bestämmas i förväg utifrån beräkningar av statistisk styrka så att åtminstone en fördubbling i DL-frekvensen kan upptäckas (dvs. tillräckligt många befruktade honor så att minst 400 implantat erhålls) (20) (21) (22) (23) och så att minst en död implantat per analysenhet (dvs. parningsgrupp per dos) kan förväntas (24).

Administreringsperiod och parningsintervall

21. Antalet parningar efter behandling styrs av behandlingsschemat, och det måste garanteras att samtliga faser i hanens könsellsmognad utvärderas inför DL-försöket (25). För en enskild behandling ska minst fem doser administreras dagligen, och 8 (möss) eller 10 (råttor) parningar ska genomföras veckovis efter den sista behandlingen. Vid administrering av flera doser kan antalet parningar reduceras i proportion till den ökade tidsperioden för administreringen, men målet att utvärdera samtliga faser av spermatogenes (efter 28 dagars exponering räcker det t.ex. med fyra parningar i veckan för att utvärdera samtliga faser av spermatogenes hos möss). Alla behandlings- och parningsscheman ska motiveras vetenskapligt.
22. Honorna ska stanna kvar hos hanarna minst så länge ägglossningscykeln varar (en vecka täcker ägglossningscykeln hos både möss och råttor). Honor som inte parat sig under ett veckointervall kan användas för nästkommande parningsintervall, eller tills parning har skett, vilket påvisas genom förekomst av sperma i vaginan eller av en vaginalpropp.
23. Exponeringen och parningsregimen styrs av syftet med DL-försöket. Om syftet är att avgöra om en given kemikalie i sig inducerar DL-mutation bör en hel spermatogenes exponeras (t.ex. för möss 7 veckors exponering med 5–7 behandlingar per vecka), och parning bör genomföras en gång i slutet. Om syftet i stället är att identifiera vilken könsellstyp som är känslig för DL-induktion är en enstaka exponering eller en 5-dagars exponering att föredra.

Dosnivåer

24. Om det inte redan finns lämpliga data som kan ge vägledning om dosval och ett förberedande test därför utförs för att fastställa koncentrationsintervallet, bör denna undersökning utföras i samma laboratorium, och med samma arter, stammar, kön och behandlingsschema som senare ska användas i huvudundersökningen (26). Syftet med undersökningen bör vara att identifiera högsta tolererbara dos (MTD), som definieras som den dos som tolereras utan bevis för toxicitet som begränsar undersökningen i förhållande till dess varaktighet (t.ex. genom att inducera minskad kroppsvikt eller hematopoietisk systemcytotoxicitet, men inte dödlighet eller tecken på smärta, lidande eller ångest som kräver human avlivning (27).
25. MTD får inte heller påverka parningsframgången negativt (21).
26. Testkemikalier med specifika biologiska verkningar vid låga icke-toxiska doser (t.ex. hormoner och mitogena ämnen) och kemikalier som uppvisar mättnad för toxikokinetiska egenskaper kan vara undantag från kriterierna för dosbestämning och bör utvärderas från fall till fall.
27. För att inhämta data om dosrespons bör en fullständig undersökning omfatta en negativ kontrollgrupp och minst tre dosnivåer som vanligen skiljer sig med en faktor 2, men inte högre än 4. Om testkemikalien inte visar toxicitet i en dosfinnande studie eller baserat på befintliga uppgifter bör den högsta dosen för engångsdosering vara 2 000 mg/kg kroppsvikt. Om testkemikalien orsakar toxicitet bör MTD vara den högsta dosen, och de dosnivåer som används bör helst omfatta ett intervall från maxdos till en dos som producerar liten eller ingen toxicitet. För icke-toxiska kemikalier med en administreringsperiod på 14 dagar eller mer är den högsta dosen (gränsdosen) 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag. För administreringsperioder på mindre än 14 dagar är den högsta dosen 2 000 mg/kg kroppsvikt/dag.

Administrering av doser

28. Den förväntade exponeringsvägen för människor bör beaktas vid utformningen av en analys. Därför kan exponeringsvägar (t.ex. via kosten eller dricksvattnet, lokalt subkutant, intravenöst, topiskt, genom inhalation, oralt (via sond) eller genom implantation) väljas som former för motiverad exponering. Exponeringsvägen bör i alla händelser väljas för att säkerställa lämplig exponering av målvävnaden. Intraperitoneal injektion rekommenderas generellt inte eftersom den inte är en avsedd exponeringsväg för människor, och bör endast användas med specifik vetenskaplig motivering. Om testkemikalien blandas i födan eller dricksvattnet bör man, särskilt i fråga om engångsdosering, se till att fördröjningen mellan födo- och vattenintag och provtagning är tillräcklig för att upptäcka effekterna (punkt 31). Den maximala vätskevolymen som kan administreras via sond eller injektion vid ett tillfälle är beroende av försöksdjurets storlek. Volymen bör normalt inte överstiga 1 ml per 100 g kroppsvikt, utom för vattenlösningar där högst 2 ml/100 g får användas. Användning av större volymer än så (om det är tillåtet enligt djurskyddslagstiftningen) ska motiveras.

Variationer i testvolym bör minimeras genom justering av koncentrationen för att säkerställa en konstant volym i relation till kroppsvikten vid alla dosnivåer.

Observationer

29. Allmänna kliniska observationer av försöksdjuren bör utföras och kliniska tecken registreras minst en gång per dag, helst vid samma tidpunkt med hänsyn till maximalt förväntade effekter efter doseringen. Alla djur bör observeras minst två gånger dagligen under doseringsperioden beträffande morbiditet och mortalitet. Alla djur bör vägas när undersökningen inleds och åtminstone en gång i veckan under undersökningar med upprepad dosering samt vid avlivning. Mätning av foderkonsumtion bör göras minst en gång i veckan. Om testkemikalien tillförs via dricksvattnet bör även vattenkonsumtionen mätas vid varje byte av vatten och minst en gång i veckan. Djur som uppvisar icke-dödliga indikatorer på överskottstoxicitet bör avlivas innan slutförandet av testperioden (27).

Vävnadsinsamling och hantering

30. Honor ska avlivas under den andra halvan av dräktigheten, nämligen på dräktighetsdag (GD) 13 för möss och GD 14–15 för råttor. Livmödrarna undersöks för att fastställa dominanta letala effekter och bestämma antalet implantat, levande och döda embryon samt gulkroppar.
31. Livmoderhornen och äggstockarna blottläggs så att gulkropparna kan räknas och foster tas bort, räknas och vägas. Livmodern bör undersökas noggrant så att resorptioner som döljs av levande foster upptäcks och samtliga resorptioner kan räknas. Fosterdödlighet ska registreras. Även antalet framgångsrikt befruktade honor och det totala antalet implantat, antalet missfall före implantation samt fallen av mortalitet efter implantation (inklusive tidiga och sena resorptioner) ska registreras. Synliga foster kan bevaras i Bouins lösning i minst två veckor och därefter undersökas för större yttre missbildningar (28), i syfte att ge ytterligare information om testämnets effekter på reproduktion och utveckling.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

32. Data ska ställas upp i tabellform och ange antal parade hanar samt antal dräktiga och icke dräktiga honor. Resultaten av varje enskild parning, inbegripet identifiering av varje hane och hona, ska anges separat. Parningsintervallet, dosnivån för behandlade hanar samt antalet levande respektive döda implantat per hona ska registreras.

33. Postimplantationsförlusten beräknas genom dödskvoten bland det totala antalet implantat i den behandlade gruppen i förhållande till dödskvoten bland det totala antalet implantat i gruppen med vehikel-/lösningsmedelskontroll.
34. Den letala verkan före implantation beräknas som skillnaden mellan antalet gulkroppar och antalet implantat eller som en minskning av det genomsnittliga antalet implantat per hona i jämförelse med kontrollparningarna. Om en utvärdering av den letala verkan före implantation sker ska denna anges.
35. Den dominanta letala faktorn (DL-faktorn) beräknas enligt följande: (dödsfall efter implantation/totalt antal implantationer per hona) $\times$ 100.
36. Uppgifter om toxicitet och kliniska tecken (enligt punkt 29) ska redovisas.

Acceptanskriterier

37. Följande kriterier avgör om testet är godtagbart.
- Parallella negativa kontroller stämmer överens med publicerade normer för historiskt negativa data, och laboratoriets historiska kontrolldata finns tillgängliga (se punkterna 10 och 18).
 - Parallella positiva kontroller framkallar reaktioner som överensstämmer med publicerade normer för historiskt positiv kontrolldata, eller med laboratoriets historiska positiva kontrolldatabas om en sådan finns, och genererar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den negativa kontrollen (se punkterna 17 och 18).
 - Ett tillräckligt antal implantat och doser ska ha analyserats (punkt 20).
 - Urvalskriterierna för högsta dos överensstämmer med de kriterier som beskrivs i punkterna 24 och 27.

Utvärdering och tolkning av resultaten

38. Minst tre behandlade dosgrupper bör analyseras för att ge tillräckligt med uppgifter för dos-responsanalysen.
39. Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses en testkemikalie vara klart positiv om något av följande inträffar:
- Åtminstone en av testdoserna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.
 - Ökningen är dosrelaterad under åtminstone en testbetingelse (t.ex. ett veckovis parningsintervall) vid utvärdering med ett lämpligt test.

- Några av resultaten faller utanför de godtagbara värdena för negativa kontrolldata, eller fördelningen av laboratoriets historiska negativa kontrolldata (t.ex. en Poisson-baserad kontrollgräns på 95 %) om sådan finns.

Testkemikalien ska då anses kunna orsaka dominanta letala mutationer i försöksdjurens könsceller. Rekommendationer om de lämpligaste statistiska metoderna beskrivs i punkt 44. För övriga rekommenderade statistiska metoder, se litteraturen (20) (21) (22) (24) (29). Statistiska tester som används bör betrakta djuret som den experimentella enheten.

40. Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses en testkemikalie vara klart negativ om något av följande inträffar:

- Ingen av testdoserna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.
- Det finns ingen dosrelaterad ökning under någon testbetingelse.
- Samtliga resultat ligger inom de godtagbara värdena för negativ kontrolldata, eller för distributionen av laboratoriets historiska negativa kontrolldata (t.ex. en Poisson-baserad kontrollgräns på 95 %) om sådan finns.

Testkemikalien ska då anses inte kunna orsaka dominanta letala mutationer i försöksdjurens könsceller.

41. Det finns inget krav på verifiering av ett tydligt positivt eller ett tydligt negativt svar.

42. Om responsen varken är tydligt negativ eller positiv bör uppgifterna utvärderas av en expert och/eller ytterligare undersökningar genomföras med tillgängliga försöksdata, i syfte att etablera resultatets biologiska relevans (t.ex. vid en svag ökning eller en ökning som är på gränsen) och för att avgöra om det positiva resultatet faller utom de acceptabla värdena för negativa kontrolldata, eller utanför laboratoriets historiska negativa kontrolldata (30).

43. I sällsynta fall är det, trots ytterligare undersökningar, inte möjligt att dra en slutsats om huruvida testkemikalien ger positiva eller negativa resultat och i dessa fall anses undersökningen vara tvetydig.

44. Statistiska tester som används bör betrakta hanen som den experimentella enheten. Även om data som avser antal (t.ex. antal implantat per hona) kan distribueras enligt Poisson-metoden och även om proportionerna (t.ex. proportionen döda implantat) kan distribueras binomialt brukar sådana data ofta vara överdispigerade (31). Den statistiska analysen bör därför inledas med ett test av över- respektive underdispigerering med hjälp av ett varianstest i form av t.ex. Cochrans binomiala varianstest (32) eller Tarones $C(\alpha)$ -test för binomial överdispigerering (31) (33). Om inga avvikelser från den binomiala dispergeringen detekteras kan proportionstrender över dosnivå testas med hjälp av Cochran-Armitage trendtest (34), och parvis jämförelser kan göras med kontrollgruppen med hjälp av Fishers signifikanstest (35). Även om inga avvikelser från Poissons

dispergering detekteras kan beräkningen testas för trender genom användning av Poissons regression (36), och parvis jämförelser kan göras med kontrollgruppen enligt Possion-modellen genom att parvisa kontraster används (36). Om en betydande över- eller underdispergering upptäcks rekommenderas icke-parametriska metoder (23) (31). Dessa omfattar rankbaserade tester, t.ex. Jonckheere-Terpstra-testet för trender (37) och Mann-Whitney-testet (38) för parvisa jämförelser med gruppen med vehikel-/lösningsmedelskontroll, liksom permutation, ny provtagning eller bootstraptester för trender och parvisa jämförelser med kontrollgruppen (31) (39).

45. Ett positivt DL-försök tyder på att testkemikalien har genotoxisk verkan på könscellerna hos den behandlade hanen av den testade arten.
46. Prövning av om de observerade värdena ligger inom eller utanför det historiska kontrollområdet kan ge vägledning för att utvärdera responsens biologiska betydelse (40).

Testrapport

47. Testrapporten ska innehålla följande information:

Sammanfattning.

Testkemikalie:

- Källa, satsnummer, sista förbrukningsdag om detta anges.
- Testkemikaliens stabilitet i sig, om den är känd.
- Testkemikaliens löslighet och stabilitet i lösningsmedlet, om den är känd.
- Mätning av pH, osmolalitet och fällningar i det odlingsmedium till vilket testkemikalien tillsattes, i förekommande fall.

Monokomponentämne:

- fysikaliskt tillstånd, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,
- kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.

Multikomponentämne, UVCB-ämne och blandning:

- karakteriseras så långt som möjligt genom kemisk beteckning (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.

Beredning av testkemikalien:

- motivering för val av vehikel.
- Löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt.

- Beredning av foder, dricksvatten eller inandningsberedningar.
- Analytiska bestämningar av beredningar (t.ex. stabilitet, homogenitet, nominella koncentrationer) om sådana görs.

Försöksdjur:

- Art/stam som används och motivering av valet.
- Djurens antal, ålder och kön.
- Ursprung, inhysning, foder osv.
- Metod för unik identifiering av djuren.
- För korttidsstudier: Individuell vikt hos försöksdjuren vid försökets början och vid slutet av testet. För undersökningar som varar längre än en vecka: Individuella kroppsvikter under studien och foderförbrukning. Kroppsviktsintervallet, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp bör inkluderas.

Testbetingelser:

- Positiva och negativa kontrolldata (vehikel/lösningsmedel).
- Data från den dosfinnande studien.
- Grund för valet av dosnivå.
- Uppgifter om beredning av testkemikalien.
- Uppgifter om administreringen av testkemikalien.
- Grund för administreringsväg.
- Metoder för mätning av djurtoxicitet, inklusive, i förekommande fall, histopatologiska eller hematologiska analyser och frekvensen av djurobservationer och mätningar av djurens kroppsvikt.
- Metoder för att verifiera att testkemikalien nått målvävnaden eller den allmänna cirkulationen om negativa resultat erhålls.
- Faktisk dos (mg/kg kroppsvikt/dag) som beräknats genom dietens/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (ppm) och konsumtion, i tillämpliga fall.
- Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.
- Uppgifter om miljöberikning i burarna.
- Detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman samt motivering av valen.
- Smärtlindringsmetod.
- Metod för avlivning.

- Förfaranden för att isolera och bevara vävnader.
- Ursprungs- och partinummer för alla satser och reagenser (i förekommande fall).
- Metoder för räkning av DL-mutanter.
- Parningsschema.
- Metod för bestämning av om parning skett.
- Avlivningstid.
- Kriterier för gradering av DL-effekter, inklusive gulkroppar, implantat, resorptioner, missfall före implantation samt levande och döda implantat.

Resultat:

- Djurens skick före och under hela testperioden, inklusive tecken på toxicitet.
- Hanarnas kroppsvikt under behandlings- och parningsperioderna.
- Antal parade honor.
- Dos/respons-förhållandet, där detta är möjligt.
- Data från jämsides behandlad och tidigare negativ kontroll med omfång, medelvärden och standardavvikelser.
- Parallella positiva kontrolldata.
- Tabelldata för varje moderdjur inklusive: Antalet gulkroppar. Antal implantat per moderdjur. Antal resorptioner och missfall före implantation per moderdjur. Antal levande implantat per moderdjur. Antal döda implantat per moderdjur. Fostervikter.
- En summering av ovanstående data för varje parningsperiod och dos, med DL-frekvenser.
- De statistiska analyser och metoder som använts.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser

LITTERATURHÄNVISNINGAR

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment Nr. 234, OECD, Paris.
- (2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.* (Eds.) s. 235–334, Elsevier, Amsterdam
- (3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Froberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., och Wiemann, H. (1978). Standardprotokoll för DL-försök på hanmöss. Sammanställt av arbetsgruppen "Dominant lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol.*, s. 39, 173–185.
- (4) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. *Mutation Res*, 352:159–167.
- (5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. och Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. *Mutation Res.*, 48:267–270.
- (6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. och Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. *Mutation Res.*, 397:77–74.
- (7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. och Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol. Lett.* 20:325–329.
- (8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. och Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 3:80–85.
- (9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., och Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, *Mutation Res.*, s. 33, 239–249.
- (10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. och Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. *Biol. Reprod.*, 70:616–624.

- (11) Marchetti F. och Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. *Birth Defects Res.*, 75:112–129.
- (12) Adler, I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. *Mutation Res.*, 352:169–172.
- (13) Favor J., och Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, *Mutation Res.*, 53: 21–27.
- (14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. och Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. *Mutation Res.*, 345:167–180.
- (15) Hastings S.E., Huffman K.W. och Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, *Mutation Res.*, 40:371–378.
- (16) James D.A. och Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, *Mutation Res.*, 99:303–314.
- (17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. och Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. *Mutation Res.*, 173:35–40.
- (18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. and Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, *Mutation Res.*, 296: 143–156.
- (19) Holstrom L.M., Palmer A.K. och Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In *Supplementary Mutagenicity Tests*. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, s. 129–156.
- (20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. och Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, *Mutation Res.*, 417:19–30.
- (21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. *Mutation Res.*, 312:313–318.
- (22) Generoso W.M. och Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. *Methods, Toxicol.*, 3A:124–141.

- (23) Haseman J.K. och Soares E.R. (1976). The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. *Mutation. Res.*, 41: 277–288.
- (24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, 1:353–360.
- (25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., och Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. *Mutation. Res.*, 85:417–429.
- (26) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Rapport från det brittiska toxikologisällskapet/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagen.*, 7:313–319.
- (27) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.19.), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (28) Barrow M.V., Taylor W.J. och Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, s. 127, 291–306.
- (29) Kirkland D.J., (Ed.) (1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.
- (30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. och Thybaud V. (2011). ”Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data”, *Mutation. Res.*, 723:87–90.
- (31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. and Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. *Mutation. Res.*, 272:35–58.
- (32) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. *Biometrics*, 10: 417–451.
- (33) Tarone, R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585–590.
- (34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. I: *Encyclopedia of Statistical Sciences*, volym 9, Kotz S. och Johnson N. L. (Eds.), s. 334–336. John Wiley and Sons, New York.

- (35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London.
- (36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. och Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, Chapters 14 and 17. McGraw-Hill, Boston
- (37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika*, 41:133–145.
- (38) Conover W.J. (1971). Praktisk icke-parametrisk statistik. John Wiley and Sons, New York
- (39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.
- (40) Fleiss J. (1973). Statistiska metoder för gradering och proportioner. John Wiley and Sons, New York.

Tillägg 1

DEFINITIONER

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Gulkroppar: Den hormonella sekretstruktur som formas kring äggstocken på sidan av den äggledare varifrån ägget har lossnat. Antalet gulkroppar i äggstockarna motsvarar antalet ägg som har avgivits.

Dominant letal mutation: en mutation som sker i en könscell eller som fixeras efter befruktning och som dödar embryon eller foster.

Fertilitetsgrad: antal befruktade honor i förhållande till antal parade honor.

Parningsintervall: tiden mellan exponeringens slut och parningen av behandlade hanar. Genom att kontrollera detta intervall kan de olika kemiska effekterna på olika sorters könsceller bedömas. Vid musparning under första, andra, tredje, fjärde, femte, sjätte, sjunde och åttonde veckan efter exponering mäts effekterna på spermier, kondenserade spermatider, runda spermatider, pakytena spermatider, tidiga spermatocyter, differentierade spermatogonier, differentierande spermatogonier och stamcellsspermatogonier.

Missfall före implantation: skillnaden mellan antalet implantat och antalet gulkroppar. Missfall före implantation kan även uppskattas genom att jämföra det totala antalet implantat per hona i behandlade grupper respektive kontrollgrupper.

Missfall efter implantation: kvoten döda implantat i den behandlade gruppen jämfört med dödskvoten bland samtliga implantat i kontrollgruppen.

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

UVCB-ämne: kemisk substans av okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter och biologiskt material.

Tillägg 2

TIDSFÖRLOPP FÖR SPERMATOGENESEN HOS DÄGGDJUR

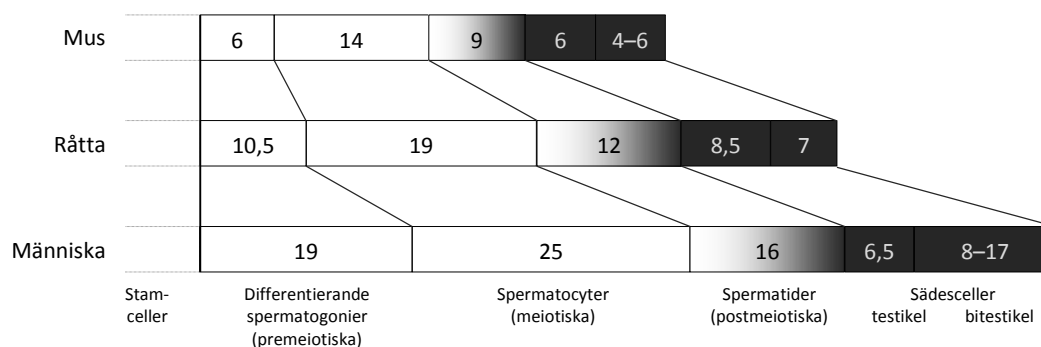


Fig. 1: En jämförelse av tiden (antal dagar) det tar för hanliga könsceller att utvecklas i möss, råttor och människor. Ingen DNA-reparation sker under de skuggade perioderna.

Ett schema över spermatogenesisen hos möss, råttor och människor visas ovan (hämtat från Adler, 1996). Odifferentierade spermatogonier omfattar A-enkel, A-dubbel och A-justerade spermatogonier (Hess och de Franca, 2008). A-enkel anses vara den sanna stamcellen, och för att bedöma effekterna på stamceller måste det därför gå minst 49 dagar (för möss) mellan den sista injektionen av testkemikalien och parningen.

Litteraturhänvisningar

Adler, I.D (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. *Mutat Res*, 352:169–172.

Hess, RA, De Franca LR (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. I: *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences and Springer Science&Business Media:1-15.”

4) I del B ska kapitel B.23 ersättas med följande:

”B.23 SPERMATOGONIALT TEST AV KROMOSOMAVVIKELSER HOS DÄGGDJUR

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 483 (2016). Testmetoder ses regelbundet över med avseende på vetenskaplig utveckling, nya bestämmelser samt djurens välbefinnande. Den modifierade versionen av den här testmetoden återspeglar många års erfarenhet av att använda det här testet och visar testets potential för att integreras och kombineras med andra toxicitets- eller genotoxicitetstest. Genom att kombinera olika toxicitetstest kan antalet försöksdjur som behövs för toxicitetstestet potentiellt minskas kraftigt. Denna testmetod är en del av en serie av testmetoder för genetisk toxikologi. Ett OECD-dokument som ger kortfattad information om tester inom genetisk toxikologi och en översikt över de senaste ändringarna av dessa testriktlinjer har utarbetats (1).
2. Syftet med testet av spermatogoniala kromosomavvikelser in vivo hos däggdjur är att identifiera kemikalier som orsakar strukturella kromosomavvikelser i spermatogoniala celler hos däggdjur (2) (3) (4). Detta test är dessutom relevant för bedömning av genotoxicitet eftersom faktorer rörande in vivo-metabolism, farmakokinetik och DNA-reparationsprocesser är aktiva och bidrar till responsen, även om de kan variera mellan olika arter. Denna testmetod är inte avsedd att mäta numeriska avvikelser, och testet används i regel inte i detta syfte.
3. Det här testet mäter strukturella kromosomavvikelser (av både kromosom- och kromatidtyp) i spermatogoniala könsceller som är under delning och förväntas därför kunna förutsäga induktion av ärftliga mutationer i dessa könsceller.
4. Definitioner av centrala begrepp anges i tillägget.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

5. Gnagare används rutinmässigt i detta test, men även andra arter kan i vissa fall vara lämpliga om det är vetenskapligt motiverat. Standardcytogenetiska beredningar av testiklar från gnagare genererar mitotiska (spermatogonier) och meiotiska (spermatocyter) metafaser. Mitotiska och meiotiska metafaser identifieras utifrån kromosomernas morfologi (4). Detta cytogenetiska in vivo-test används för att påvisa strukturella kromosomavvikelser i spermatogoniala mitoser. Andra målceller omfattas inte av denna metod.
6. För att upptäcka avvikelser beträffande kromatidtyp i spermatogoniala celler bör den första mitotiska celldelningen efter behandlingen undersökas innan dessa avvikelser omvandlas till avvikelser av kromosomtyp i de efterföljande celldelningarna. En meiotisk kromosomanalys avseende strukturella kromosomavvikelser i diakines–metafas I och metafas II kan ge ytterligare information om behandlade spermatocyter.

7. Det finns flera generationer av spermatogonier i testiklarna (5), och dessa olika könscellstyper kan uppvisa olika känslighet för kemisk behandling. De avvikelser som upptäcks utgör därför en samlad respons på behandlade spermatogoniala cellpopulationer. Majoriteten av de mitotiska cellerna i testikelberedningarna utgörs av B-spermatogonier, som har en cellcykel på ungefär 26 h (3).
8. Om det finns bevis för att testkemikalien eller dess metabolit(er) inte kommer att nå testiklarna är det olämpligt att använda detta test.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

9. Försöksdjuren exponeras för testkemikalien genom en lämplig exponeringsväg och avlivas sedan humant vid en lämplig tid efter behandlingen. Innan de avlivas behandlas djuren med ett ämne som gör att celler stannar upp i metafase (t.ex. kolkicin eller kolkemid®). Kromosomberedningar görs sedan från könsceller och färgas in, varpå de celler som är i metafase analyseras med avseende på kromosomavvikelser.

KVALIFIKATIONSPRÖVNING AV LABORATORIET

10. Kompetens för detta test ska fastställas genom uppvisad förmåga att reproducera förväntade resultat för strukturella kromosomavvikelsefrekvenser i spermatogonier med positiva kontrollämnena (inklusive svaga responser), t.ex. de som listas i tabell 1, och erhålla negativa kontrollfrekvenser som stämmer överens med acceptabla värden för kontrolldata i litteraturen (t.ex. (2) (3) (6) (7) (8) (9) (10)) eller med laboratoriets historiska kontrollfördelning, om sådan finns.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Beredningar

Val av djurart

11. Friska yngre adulta exemplar från normala laboriestammar bör användas. I regel används hanmöss, men hanar av andra lämpliga däggdjursarter kan användas om detta kan motiveras vetenskapligt och om det är en förutsättning för att samköra detta test med en annan testmetod. Om andra arter än gnagare används bör en vetenskaplig motivering lämnas i rapporten.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

12. För gnagare bör temperaturen i djurutrymmena vara 22 °C (± 3 °). Den relativa fuktigheten bör helst vara 50–60 %, men minst 40 %, och bör helst inte överstiga 70 % utom när rummet rengörs. Artificiell belysning bör användas, med en dygnsrytm på 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodring kan konventionellt laboriefoder användas med obegränsad tillgång till dricksvatten. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie när den administreras genom denna väg. Gnagare bör inhysas i små grupper (högst fem per bur), förutsatt att inget aggressivt beteende kan förväntas, och företrädesvis i

fasta golvburar med lämplig miljöberikning. Djuren får hållas individuellt om det är vetenskapligt motiverat.

Förberedelse av djuren

13. Friska yngre adulta hanar (8–12 veckor gamla vid behandlingsstarten) används vanligen, och dessa väljs slumpvis ut till kontroll- och behandlingsgrupperna. Djuren ska ha en unik identifiering som appliceras med en human och minimalt invasiv metod (t.ex. ringmärkning, taggar, mikrochipp eller biometrisk identifiering, men inte öron- eller tassclips). De bör vänjas vid förhållandena i laboratoriet under minst fem dagar. Burarna placeras på sådant sätt att eventuella verkningar på grund av placeringen minimeras. Korskontaminering av den positiva kontrollen och testkemikalien bör undvikas. Vid testets början bör variationen i vikt mellan individuella djur vara minimal, och den får inte överstiga $\pm 20\%$.

Beredning av doser

14. Fasta testkemikalier bör lösas upp eller suspenderas i lämpliga lösningsmedel eller vehiklar eller blandas i foder eller dricksvatten innan dosen administreras till djuren. Testkemikalier i flytande form kan doseras direkt eller spädas ut före doseringen. Vid inhalationsexponering kan testkemikalier administreras såsom gas, ånga eller en fast/flytande aerosol, beroende på deras fysikalisk-kemiska egenskaper. Nygjorda beredningar av testkemikalien bör användas om inte stabilitetsdata visar att lagringen är acceptabel och lämpliga lagringsförhållanden bör fastställas.

Testbetingelser – Lösningsmedel/vehikel

15. Lösningsmedlet/vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna reagera kemiskt med testkemikalierna. Om andra lösningsmedel/vehiklar än de gängse används bör det finnas referensdata som visar att de är kompatibla. Det rekommenderas att man alltid när det är möjligt överväger vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar som första alternativ. Exempel på vanliga kompatibla lösningsmedel/vehiklar är vatten, fysiologisk saltlösning, metylcellulosalösning, karboximetylcellulosa natriumsaltlösning, olivolja och majsolja. I avsaknad av historiska eller publicerade kontrollerdata som visar att inga strukturella kromosomavvikelser eller andra skadliga effekter induceras av de valda atypiska lösningsmedlen/vehiklarna bör en preliminär undersökning utföras för att fastställa acceptansen för lösningsmedels-/vehikelkontrollen.

Positiva kontroller

16. Parallella positiva kontrolldjur bör alltid användas såvida inte laboratoriet har påvisat sin duglighet för testet i fråga och utfört testet rutinmässigt under de senaste åren (t.ex. under de senaste 5 åren). Om en parallell positiv kontrollgrupp inte ingår bör klassificeringskontroller (fasta och ofläckade utstryksglas) inkluderas i varje försök. Detta kan åstadkommas genom att

inbegripa lämpliga referensprover i klassificeringen av undersökningen som har erhållits och lagrats från ett separat positivt kontrollförsök som utförs med jämna mellanrum (t.ex. var 6:e till 18:e månad) på det laboratorium där testet utförs, t.ex. under kvalifikationsprövning och vid behov med jämna mellanrum därefter.

17. Positiva kontrollämnen bör på ett tillförlitligt sätt ge en detekterbar ökning i frekvensen av celler med strukturella kromosomavvikelser över den spontana nivån. Positiva kontrolldoser bör väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga men inte omedelbart avslöjar identiteten hos de kodade proverna för bedömaren. Exempel på positiva kontrollämnen ges i tabell 1.

Tabell 1: I tabellen nedan ges några exempel på positiva kontrollämnen.

Substanser [CAS-nr] (referensnummer)
Cyklofosfamid (monohydrat) [CAS-nr 50-18-0 (CAS-nr 6055-19-2)] (9)
Cyklohexylamin [CAS-nr 108-91-8] (7)
Mitomycin C [CAS-nr 50-07-7] (6)
Monomerisk akrylamid [CAS-nr 79-06-1] (10)
Trietylenmelamin [CAS-nr 51-18-3] (8)

Negativa kontroller

18. Negativa kontroller, behandlade med lösningsmedel eller endast vehikel, och i övrigt behandlade på samma sätt som behandlingsgrupperna, bör inkluderas för varje provtagningstillfälle. I avsaknad av historiska eller publicerade kontrolldata som visar att inga kromosomavvikelser eller andra skadliga effekter induceras av de valda lösningsmedlen/vehiklarna bör obehandlade kontrolldjur också inkluderas för varje provtagningstillfälle för att fastställa acceptansen för vehikelkontrollen.

FÖRFARANDE

Antal försöksdjur

19. Gruppernas storlek bör fastställas vid inledning av studien, och målet bör vara minst fem hanar per grupp. Detta antal djur per grupp anses vara tillräckligt för att ge lämplig statistisk styrka (dvs. i regel kan minst en fördubbling i kromosomavvikelsefrekvensen detekteras vid en negativ kontrollnivå på 1,0 % eller mer med 80 % sannolikhet vid en signifikansnivå på 0,05) (3) (11). Som en vägledning för ett vanligt krav på maximalt antal djur skulle det krävas 45 djur för en benmärgsundersökning med två provtagningstillfällen, tre dosgrupper och en parallell negativ kontrollgrupp plus en positiv kontrollgrupp (fem djur i varje grupp).

Behandlingsschema

20. Testkemikalierna administreras i regel vid ett tillfälle (dvs. enstaka behandling), men andra doseringsmetoder kan användas under förutsättning att de är vetenskapligt motiverade.
21. I den högsta dosgruppen används två provtagningstider efter behandlingen. Eftersom den tid som krävs för upptag och metabolism av testkemikalien såväl som dess effekt på cellcykelns kinetik kan påverka den optimala tiden för detektion av kromosomavvikelser rekommenderas en tidig och en sen provtagning, ca 24 respektive 48 timmar efter behandling. För övriga doser än maxdosen ska en tidig provtagning göras 24 timmar efter behandlingen (kortare eller lika lång som cellcykeltiden för B-spermatogonier och därför optimal för att detektera de första metafaserne efter behandlingen), om ingen annan provtagningstid anses mer lämplig och därför är motiverad.
22. Andra provtagningstider kan användas. När det t.ex. gäller fall där kemikalier kan ge upphov till S-oberoende effekter, kan tidigare provtagningstider (dvs. kortare än 24 h) vara lämpliga.
23. En behandling med upprepade doser kan användas, t.ex. i kombination med ett test avseende en annan endpoint för vilket en 28 dagars administreringsperiod används (t.ex. TM B.58), men i så fall behövs ytterligare djurgrupper för att förena olika provtagningstider. Det måste fastställas att ett sådant schema är vetenskapligt lämpligt och motiveras från fall till fall.
24. Innan djuren avlivas bör de injiceras intraperitonealt med en lämplig dos av ett ämne som stoppar celldelningen i metafase (t.ex. kolkemid[®] eller kolchicin). Provtagning på försöksdjur sker därefter med lämpliga intervall. För möss och råttor är detta intervall ca 3–5 timmar.

Dosnivåer

25. Om det inte finns lämpliga data från andra relevanta undersökningar som kan ge vägledning om dosval och en preliminär undersökning därför utförs för att fastställa omfattningen, bör denna undersökning utföras i samma laboratorium och med samma arter, stammar, kön och behandlingsschema som senare ska användas i huvudundersökningen enligt gällande rekommendationer för dosfinnande studier (12). Syftet med undersökningen bör vara att identifiera högsta tolererbara dos (MTD), som definieras som den dos som inducerar små toxiska effekter i förhållande till undersökningsperiodens varaktighet (t.ex. onormalt beteende eller onormala reaktioner, mindre viktninskningar eller hemapatopoietisk cytotoxicitet) men inte dödlighet eller tecken på smärta, lidande eller ångest, vilket kräver avlivning av försöksdjuren i fråga (13).
26. Den högsta dosen kan även definieras som en dos vilken ger upphov till någon indikation på toxicitet i de spermatogoniala cellerna (t.ex. en reduktion i kvoten av spermatogoniala mitoser hos den första och den andra meiotiska metafasen). Denna reduktion bör inte överskrida 50 %.
27. Testkemikalier med specifika biologiska verkningar vid låga icke-toxiska doser (t.ex. hormoner och mitogena ämnen) och kemikalier som uppvisar mättnad för toxikokinetiska egenskaper kan vara undantag från kriterierna för dosbestämning och bör utvärderas från fall till fall.

28. För att inhämta data om dosrespons bör en fullständig undersökning omfatta en negativ kontrollgrupp (punkt 18) och minst tre dosnivåer som vanligen separeras av en faktor på minst 2 men max 4. Om testkemikalien inte visar toxicitet i en dosfinnande studie eller baserat på befintliga uppgifter bör den högsta dosen för engångsdosering vara 2 000 mg/kg kroppsvikt. Men om testkemikalien orsakar toxicitet bör MTD vara den högsta administrerade dosen, och de dosnivåer som används bör helst omfatta ett intervall från maxdos till en dos som producerar liten eller ingen toxicitet. När toxicitet observeras i målvävnaden (dvs. testiklarna) vid alla testade dosnivåer rekommenderas fortsatta undersökningar med icke-toxiska doser. Undersökningar som syftar till att mer grundligt karakterisera kvantitativ information om dosrespons kan kräva ytterligare dosgrupper. Dessa gränser kan variera för vissa typer av testkemikalier (t.ex. humanläkemedel) som omfattas av särskilda krav. Om testkemikalien orsakar toxicitet ska gränsdosen plus två lägre doser (enligt beskrivningen ovan) väljas ut. För administreringsperioder på 14 dagar eller mer är gränsdosen 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag, och för administreringsperioder på mindre än 14 dagar är gränsdosen 2 000 mg/kg kroppsvikt/dag.

Administrering av doser

29. Den förväntade exponeringsvägen för människor bör beaktas vid utformningen av en analys. Därför kan exponeringsvägar (t.ex. via kosten, via dricksvattnet, lokalt subkutant, intravenöst, oralt (via sond), via inhalation eller genom implantation) väljas som motiverad exponeringsväg. Exponeringsvägen bör i alla händelser väljas för att säkerställa lämplig exponering av målvävnaden. Intraperitoneal injektion rekommenderas inte, såvida den inte kan motiveras vetenskapligt, eftersom den inte är en fysiologiskt relevant exponeringsväg för människor. Om testkemikalien blandas i födan eller dricksvattnet bör man, särskilt i fråga om engångsdosering, se till att fördröjningen mellan födo- och vattenintag och provtagning är tillräcklig för att upptäcka effekterna (se punkt 33). Den maximala vätskevolymen som kan administreras via sond eller injektion vid ett tillfälle är beroende av försöksdjurets storlek. Volymen bör normalt inte överstiga 1 ml/100 g kroppsvikt, utom för vattenlösningar där högst 2 ml/100 mg kroppsvikt får användas. Användning av större volymer än så (om det är tillåtet enligt djurskyddslagstiftningen) ska motiveras. Variationer i testvolym bör minimeras genom justering av koncentrationen för att säkerställa en konstant volym i relation till kroppsvikten vid alla dosnivåer.

Observationer

30. Allmänna kliniska observationer av försöksdjuren bör utföras och kliniska tecken registreras minst en gång per dag, helst vid samma tidpunkt med hänsyn till maximalt förväntade effekter efter doseringen. Minst två gånger dagligen bör djuren observeras beträffande morbiditet och mortalitet. Alla djur bör vägas när undersökningen inleds, åtminstone en gång i veckan under undersökningar med upprepad dosering och vid avlivning. För undersökningar som varar minst en vecka bör mätning av foderkonsumtion göras minst en gång i veckan. Om testkemikalien tillförs via dricksvattnet bör även vattenkonsumtionen mätas vid varje byte av vatten och minst en gång i veckan. Djur som uppvisar icke-dödliga indikatorer på överskottstoxicitet bör avlivas innan slutförandet av testperioden (13).

Kromosompreparation

31. Omedelbart efter avlivning tas cellsuspensioner ut från en eller båda testiklarna, exponeras för en hypoton lösning och fixeras i enlighet med standardprotokoll, t.ex. (2) (14) (15). Cellerna stryks sedan ut på utstryksglas och färgas in (16) (17). Alla utstryksglas bör kodas så att deras identitet är okänd för den som utför graderingen.

Analys

32. Minst 200 väl spridda metafaser bör graderas för varje djur (3) (11). Om den historiska negativa kontrollfrekvensen är $< 1 \%$, bör mer än 200 celler graderas per djur för att öka den statistiska styrkan (3). Infärgningsmetoder som tillåter identifiering av centromeren ska användas.
33. Avvikelser av kromatid- och kromosomtyp bör registreras separat och klassificeras enligt subtyper (brott, utbyten). Luckor ska registreras men inte tas med i bedömningen av huruvida en kemikalie orsakar en betydande ökning i antal celler med kromosomavvikelser. Laboratoriets förfaranden ska säkerställa att analysen av kromosomavvikelser utförs av välutbildade bedömare. Eftersom beredningen av utstryksglas ofta resulterar i brott på en del av de celler som är i metafas med förlust av kromosomer som följd, bör de celler som påträffas därför innehålla ett centromererantal på minst $2n \pm 2$, där n är antalet haploider för kromosomerna hos den arten.
34. Även om syftet med testet är att detektera strukturella kromosomavvikelser, är det viktigt att notera frekvenserna för polyploidi och endoreduplikation när dessa händelser observeras (se punkt 44).

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

35. Individuella djurdata bör presenteras i tabellform. För varje individuellt försöksdjur bör antalet celler med strukturella kromosomavvikelser och antalet kromosomavvikelser per cell utvärderas. Avvikelser av kromatid- och kromosomtyp som klassificeras enligt subtyper (brott, utbyten) bör anges separat, med antal och intervall för försöks- och kontrollodlingarna. Luckor ska anges separat. Frekvensen av luckor rapporteras men tas i regel inte med i analysen av den totala strukturella avvikelsefrekvensen. Andelen polyploida celler och celler med endoreduplicerade kromosomer ska rapporteras om dessa företeelser observeras.
36. Data om toxicitet och kliniska tecken (enligt punkt 30) ska redovisas.

Acceptanskriterier

37. Följande kriterier avgör om testet är godtagbart.

- Parallella negativa kontroller stämmer överens med publicerade normer för historiskt negativa data, vilka i regel förväntas ligga på $> 0 \%$ och $\leq 1,5 \%$ celler med kromosomavvikelse, samt med laboratoriets historiska kontrolldata, om sådana finns (se punkterna 10 och 18).
- Parallella positiva kontroller framkallar responser som överensstämmer med publicerade normer för historiskt positiva kontrolldata, eller med laboratoriets historiska positiva kontrolldata om en sådan finns, och genererar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den negativa kontrollen (se punkterna 17 och 18).
- Ett tillräckligt antal celler och doser ska ha analyserats (se punkterna 28 och 32).
- Urvalskriterierna för högsta dos överensstämmer med de kriterier som beskrivs i punkterna 25 och 26.

38. Om såväl mitos som meios observeras bör förhållandet mellan spermatogoniala mitoser och de första och andra meiotiska metafaserna fastställas som ett mått på cytotoxicitet för alla behandlade och negativa kontrollförsöksdjur i ett totalt prov på 100 delande celler per djur. Om endast mitos observeras bör mitosindexet bestämmas i minst 1 000 celler för varje försöksdjur.

Utvärdering och tolkning av resultaten

39. Minst tre behandlade dosgrupper bör analyseras för att ge tillräckligt med uppgifter för dos-responsanalysen.

40. Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses en testkemikalie vara klart positiv om något av följande inträffar:

- Åtminstone en av testdoserna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.
- Ökningen är dosrelaterad vid minst ett provtagningstillfälle.
- Några av resultaten faller utanför de godtagbara värdena för negativa kontrolldata, eller för fördelningen av laboratoriets historiska negativa kontrolldata (t.ex. en Poisson-baserad kontrollgräns på 95 %) om sådan finns.

Testkemikalien ska då anses kunna orsaka kromosomavvikelse i försöksdjurens spermatogoniala celler. Rekommendationer om de lämpligaste statistiska metoderna finns även i litteraturen (11) (18). Statistiska tester som används bör betrakta djuret som den experimentella enheten.

41. Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses en testkemikalie vara klart negativ om något av följande inträffar:

- Ingen av testdoserna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.

- Det finns ingen dosrelaterad ökning under någon testbetingelse.
- Samtliga resultat ligger inom de godtagbara värdena för negativ kontrolldata, eller för distributionen av laboratoriets historiska negativa kontrolldata (t.ex. en Poisson-baserad kontrollgräns på 95 %) om sådan finns.

Testkemikalien ska då anses oförmögen att orsaka kromosomavvikelser i försöksdjurens spermatogoniala celler. Rekommendationer om de lämpligaste statistiska metoderna finns även i litteraturen (11) (18). Ett negativt resultat utesluter inte möjligheten att kemikalien kan orsaka kromosomavvikelser under senare icke-undersökta utvecklingsfaser, eller genmutationer.

42. Det finns inget krav på verifiering av ett tydligt positivt eller ett tydligt negativt svar.
43. Om responsen varken är tydligt negativ eller positiv bör uppgifterna utvärderas av en expert och/eller ytterligare undersökningar genomföras med tillgängliga försöksdata, i syfte att etablera resultatets biologiska relevans (t.ex. vid en svag ökning eller en ökning som är på gränsen) och för att avgöra om det positiva resultatet faller utom de acceptabla värdena för negativa kontrolldata, eller utanför laboratoriets historiska negativa kontrolldata (19).
44. I sällsynta fall är det, trots ytterligare undersökningar, inte möjligt att dra en slutsats om huruvida testkemikalien ger positiva eller negativa resultat och i dessa fall anses undersökningen vara tvetydig.
45. En ökning av antalet polyploida celler kan tyda på att testkemikalien har potential att inhibera mitotiska processer och att inducera numeriska kromosomavvikelser (20). En ökning av antalet celler med endoreduplicerade kromosomer kan tyda på att testkemikalien har potential att inhibera cellcykelns fortskridande (21) (22), vilket är en annan slags mekanism för induktion av numeriska kromosomförändringar än inhibition av mitotiska processer (se punkt 2). Därför bör förekomsten av polyploida celler och celler med endoreduplicerade kromosomer registreras separat.

Testrapport

46. Testrapporten ska innehålla följande information:

Sammanfattning.

Testkemikalie:

- Källa, satsnummer, sista förbrukningsdag, om detta anges.
- Testkemikalies stabilitet i sig, om den är känd.
- Testkemikalies löslighet och stabilitet i lösningsmedlet, om den är känd.
- Mätning av pH, osmolalitet och fällningar i det odlingsmedium till vilket testkemikalien tillsattes, i förekommande fall.

Monokomponentämne:

- fysikaliskt tillstånd, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,
- kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.

Multikomponentämne, UVCB-ämne och blandningar:

- karakteriseras så långt som möjligt genom kemisk beteckning (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.

Beredning av testkemikalien:

- motivering för val av vehikel.
- Löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet/vehikeln.
- Beredning av foder, dricksvatten eller inandningsberedningar.
- Analytiska bestämningar av beredningar (t.ex. stabilitet, homogenitet, nominella koncentrationer).
-

Försöksdjur:

- art/stam som används och motivering av valet.
- Antal djur och deras ålder.
- Ursprung, inhysning, foder osv.
- Metod för unik identifiering av djuren.
- För korttidsstudier: Individuell vikt hos försöksdjuren vid testets början och slut. För undersökningar som varar längre än en vecka: Individuella kroppsvikter under studien och foderförbrukning. Kroppsviktsintervallet, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp bör inkluderas.

Testbetingelser:

- Positiva och negativa kontrolldata (vehikel/lösningsmedel).
- Data från en preliminär undersökning, om en sådan har utförts.
- Grund för valet av dosnivå.
- Grund för administreringsväg.
- Uppgifter om beredning av testkemikalien.
- Uppgifter om administreringen av testkemikalien.
- Grund för avlivningstider.

- Metoder för mätning av djurtoxicitet, inklusive, i förekommande fall, histopatologiska eller hematologiska analyser och frekvensen av djurobservationer och mätningar av djurens kroppsvikt.
- Metoder för att verifiera att testkemikalien nått målvävnaden eller den allmänna cirkulationen om negativa resultat erhålls.
- Faktisk dos (mg/kg kroppsvikt/dag) som beräknats genom dietens/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (ppm) och konsumtion, i tillämpliga fall.
- Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.
- Detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman samt motivering av valen.
- Avlivningsmetod.
- Smärtlindringsmetod (i förekommande fall).
- Förfaranden för att isolera vävnader.
- Identitet hos kemikalie som stoppar cellcykeln i metafas, dess koncentration och behandlingens varaktighet.
- Metoder för preparation av utstryksglas.
- Kriterier för hur avvikelser påvisas.
- Antalet analyserade celler per försöksdjur.
- Kriterier för bedömning av om undersökningarna är positiva, negativa eller tvetydiga.

Resultat:

- Djurens skick före och under hela testperioden, inklusive tecken på toxicitet.
- Kropps- och organvikt vid avlivning (om flera behandlingar används ska även kroppsvikter under behandlingarna kontrolleras).
- Tecken på toxicitet.
- Mitosindex:
- Omfattning av spermatogoniala celler vid första och andra meiotiska metafasen, eller annat bevis på att målvävnaden har exponerats.
- Typ av och antal avvikelser, angivna separat för varje försöksdjur.
- Totalt antal avvikelser per grupp med medelvärden och standardavvikelser.
- Antal celler med avvikelser per grupp med medelvärden och standardavvikelser.
- Dos/respons-förhållandet, där detta är möjligt.
- De statistiska analyser och metoder som använts.
- Samtidiga negativa kontrolldata.

- Historiska negativa kontrolldata med intervall, medelvärden, standardavvikelser, samt ett 95 % konfidensintervall (i förekommande fall) eller publicerad historiska negativa kontrolldata som använts för att godkänna testresultaten.
- Parallella positiva kontrolldata.
- Förändringar i ploiditet om sådana påvisas, inklusive frekvenser för polyploida och/eller endoreduplicerade celler.

Diskussion av resultaten

Slutsats

LITTERATURHÄNVISNINGAR

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris
- (2) Adler, I.-D. (1984). Adler, I. D. (1984), Cytogenetic tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Venitt och J. M. Parry (eds). IRL Press, Oxford, Washington DC, s. 275–306.
- (3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.
- (4) Russo, A (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.
- (5) Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. I: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-15.
- (6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379. Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C, Lambert, B. and Magnusson, J. (eds) Liss, New York, pp. 477-484.
- (7) Cattanaach, B.M., och Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.
- (8) Cattanaach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.
- (9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.
- (10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): s. 313–324.
- (11) Adler I.-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. och Hayashi, M. (1998). Recommendations for statistical designs of *In Vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Res., 417, s. 19–30.

- (12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. och Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagenesis*, 7, s. 313–319.
- (13) 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.), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (14) Yamamoto, K. och Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. *Mutation Res.*, 52, s. 207–209.
- (15) Hsu, T.C., Elder, F. och Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. *Miljö. Mutagen.*, 1, s. 291–294.
- (16) Evans, E.P., Breckon, G., och Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 3, s. 289–294.
- (17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. och Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays, i: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115–141.
- (18) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. och Savage, J. R. K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, i: D. J. Kirkland (ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 184–232.
- (19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. och Thybaud, V. (2011). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Res.*, 723, s. 87–90.
- (20) Warr T.J., Parry E.M. och Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, *Mutation Res.*, 287, 29–46.
- (21) Huang, Y., Change, C. och Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. *Cancer Res.*, 43, s. 1362–1364.
- (22) Locke-Huhle, C (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. *Mutation Res.*, vol. 119, s. 403–413.

Tillägg

DEFINITIONER

Aneuploidi: alla avvikelser från det normala antalet diploida (eller haploida) kromosomer med en eller flera kromosomer, men inte med hela uppsättningar kromosomer (polyploidi).

Centromer: region(er) på en kromosom där kärnspolefibrer är fästa under celldelning, vilket möjliggör en ordnad rörelse av dotterkromosomerna mot dottercellernas poler.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Kromosomdiversitet: Variation i kromosomform (t.ex. metacentrisk, akricentisk etc.) och kromosomstorlek.

Avvikelse av kromatidtyp: strukturell kromosomskada uttryckt som brott på enstaka kromatider eller brott och återförening mellan kromatider.

Avvikelse av kromosomtyp: strukturell kromosomskada uttryckt som brott, eller som brott och återförening, på båda kromatiderna på samma ställe.

Klastogen: alla kemikalier som orsakar strukturella kromosomavvikelser i populationer av celler eller organismer.

Lucka: en akromatisk skada som är mindre än bredden på en kromatid, och med ett minimum av missanpassning hos kromatiderna.

Genotoxisk: allmän term som omfattar alla typer av DNA- och kromosomskador, inklusive brott, deletioner, addukter, modifieringar av och kopplingar mellan nukleotider, omlagringar, mutationer, kromosomavvikelser och aneuploidi. Inte alla typer av genotoxiska effekter leder till mutationer eller stabila kromosomskador.

Mitosindex (MI): den andel celler som är i metafas delat med det totala antalet celler som kan observeras i en cellpopulation, en indikation på graden av tillväxt hos populationen ifråga.

Mitos: delning av cellkärnan, i regel bestående av profas, prometafas, metafas, anafas och telofas.

Mutagent ämne: ämne som producerar en ärftlig ändring av DNA-basparsekvensen(-erna) i gener eller i kromosomstrukturen (kromosomavvikelser).

Numerisk anomali: en förändring av antalet kromosomer från det normala antalet karakteristiskt för det försöksdjur som används.

Polyploidi: en multipel av det haploida kromosomantalet (n) som skiljer sig från det diploida (dvs. $3n$, $4n$ osv.).

Strukturell avvikelse: en förändring i kromosomstrukturen som kan påvisas genom mikroskopisk undersökning av celler i metafas och som uppträder i form av deletioner och fragment samt

translokationer.

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

UVCB-ämnen: kemiska ämnen av okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter och biologiska material.”

(5) I del B ska kapitel B.40 ersättas med följande:

”B.40 HUDKORROSION IN VITRO: BESTÄMNING AV TRANSKUTANT ELEKTRISKT MOTSTÅND (TER)

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 430 (2015). Hudkorrosion innebär att det uppstår en irreversibel skada på huden i form av synlig nekros genom epidermis och in i dermis, efter applicering av en testkemikalie (enligt definitionen i Förenta nationernas globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (1) och Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP-förordningen)¹). Den uppdaterade testmetoden B.40 är en in vitro-metod för att identifiera frätande och icke frätande ämnen och blandningar i enlighet med GHS (1) och CLP.
2. Bedömningen av hudkorrosivitet har i regel inneburit användning av försöksdjur (TM B.4, likvärdig med OECD TG 404 som antogs 1981 och reviderades 1992, 2002 och 2015) (2). Utöver den föreliggande metoden TM B.40 har andra in vitro-metoder för testning av kemikaliers potential att orsaka hudkorrosion validerats och antagits, t.ex. TM B.40a (likvärdig med OECD TG 431) (3) och TM B.65 (likvärdig med OECD TG 435) (4), vilka också kan identifiera underkategorier av frätande kemikalier om så krävs. Flera validerade in vitro-testmetoder har antagits, t.ex. TM B.46 (likvärdig med OECD TG 439 (5)), för att användas i tester avseende hudirritation. I OECD:s vägledningsdokument om ett integrerat synsätt på testning och bedömning (IATA) av hudkorrosion och hudirritation beskrivs flera moduler som grupperar olika informationskällor och analysverktyg, och där det ges i) vägledning om hur tillgängliga testdata och icke testdata kan integreras och användas i bedömningen av kemikaliers potential för hudirritation och hudkorrosion, och ii) förslag på hur man ska gå till väga när det krävs ytterligare testning (6).
3. Denna testmetod gäller endpointen hudkorrosion hos människa. Den baseras på testmetoden TER, som testar transkutant elektriskt motstånd i rått hud och där hudbitar används för att identifiera frätande ämnen utifrån deras förmåga att skada den normala integriteten hos hudens hornlager och försämra dess barriärfunktion. OECD:s motsvarande testriktlinje antogs första gången 2004 och uppdaterades 2015 för att överensstämma med vägledningsdokumentet om IATA.

¹ 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. För att utvärdera in vitro-testning av hudkorrosion för lagstadgade ändamål utfördes förvalideringsstudier (7) följt av en formell valideringsstudie av TER-testmetoden för bedömning av hudkorrosion på rått hud (8) (9) (10) (11). Resultaten av dessa studier ledde till rekommendationen att TER-testmetoden (som betecknas validerad referensmetod – VRM) kunde användas för lagstadgade ändamål i syfte att bedöma hudkorrosivitet in vivo (12) (13) (14).
5. Innan en annan, liknande eller modifierad, in vitro-TER-testmetod för hudkorrosion än VRM kan användas för lagstadgade ändamål måste metodens tillförlitlighet, relevans (exakthet), och begränsningar för det föreslagna syftet bestämmas för att garantera dess likhet med VRM i enlighet med kraven i prestandastandarderna (PS) (15). OECD:s ömsesidiga dataacceptans kan endast garanteras efter att eventuella föreslagna testmetoder, nya eller uppdaterade, som följer PS har granskats och inkluderats i motsvarande OECD-testriktlinjer.

DEFINITIONER

6. Definitioner av begreppen finns i tillägget.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

7. En valideringsstudie (10) och andra publicerade studier (16) (17) har visat att TER-testmetoden för rått hud kan skilja mellan ämnen som man vet är frätande respektive icke frätande för huden med en generell känslighet på 94 % (51/54) och en specificitet på 71 % (48/68) från en databas med 122 ämnen.
8. Denna testmetod gäller hudkorrosion in vitro. Den möjliggör identifiering av frätande och icke frätande testkemikalier i enlighet med GHS/CLP. En begränsning med testmetoden som påvisats i valideringsstudierna (8) (9) (10) (11) är att den inte tillåter underkategorisering av frätande ämnen och blandningar i enlighet med GHS/CLP. Gällande regelverk inom området avgör hur testmetoden kommer att användas. Denna testmetod ger visserligen inte adekvat information om hudirritation, men det bör nämnas att TM B.46 är särskilt avsedd för hälsoeffekten hudirritation in vitro (5). För en fullständig bedömning av lokala effekter på huden efter en enstaka dermal exponering, se OECD:s vägledningsdokument om IATA (6).
9. Ett stort spektrum av kemikalier som framför allt motsvarar ämnen har testats vid den validering som ligger till grund för denna testmetod, och valideringsstudiens empiriska databas uppgick till totalt 60 ämnen och omfattade en mängd olika kemiska klasser (8) (9). Utifrån de samlade data som finns tillgängliga är testmetoden tillämplig på en mängd olika kemiska klasser och fysikaliska tillstånd, inklusive vätskor, halvfasta ämnen, fasta ämnen och vaxer. Det bör nämnas att ett jämförelsevis litet antal vaxer och frätande fasta ämnen bedömdes under valideringen. Detta beror på att det är svårt att få fram testobjekt med lämpliga referensdata för vissa fysikaliska tillstånd. Vätskorna kan vara vattenbaserade eller inte. Fasta ämnen kan vara vattenlösliga eller icke-vattenlösliga. Om det finns bevis för att testmetoden inte är tillämplig på en specifik ämneskategori bör den inte användas för denna kategori. Eftersom denna testmetod

är applicerbar på ämnen anses den även kunna användas för blandningar. Med tanke på att blandningar omfattar ett brett spektrum av kategorier och sammansättningar och det i nuläget endast finns begränsad information om testning av blandningar bör dock testmetoden inte användas på blandningskategorier för vilka den har visat sig vara icke-applicerbar (t.ex. i enlighet med den strategi som föreslås av Eskes m.fl., 2012) (18). Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag. Gaser och aerosoler har ännu inte bedömts genom valideringsstudier (8) (9). Även om det är tänkbart att de kan testas med TER-testmetoden så tillåter den aktuella testmetoden inte testning av gaser och aerosoler.

TESTPRINCIP

10. Testkemikalien appliceras och får verka i upp till 24 timmar på den epidermala ytan av hudbitar i ett testsystem med två kammare där hudbitarna fungerar som skiljemembran mellan kamrarna. Hudbitarna tas från humant avlivade, 28–30 dagar gamla råttor. Frätande kemikalier identifieras genom sin förmåga att försämra hornlagrets normala integritet och barriärfunktion, vilket kan mätas som en minskning av det transkutana elektriska motståndet (TER) under ett visst tröskelvärde (16) (se punkt 32). För TER för råttthud har ett brytvärde på $5\text{k}\Omega$ valts ut, baserat på omfattande data för ett brett urval av kemikalier där den absoluta majoriteten av värdena antingen låg klart över (ofta $> 10\text{k}\Omega$) eller klart under (ofta $< 3\text{k}\Omega$) detta värde (16). I allmänhet sänker testkemikalier som inte har någon frätande verkan på djur inte TER under detta brytvärde, oavsett om de orsakar hudirritation eller inte. Vidare kan användning av andra hudberedningar eller annan utrustning ändra brytvärdet, vilket kräver ytterligare validering.
11. Ett färgämnesbindningssteg ingår i testförfarandet för verifiering av positiva resultat vid TER-värden runt $5\text{k}\Omega$. Färgämnesbindningssteget visar om ökningen av jonpermeabiliteten beror på fysisk nedbrytning av hornlagret. TER-metoden med råttthud har visat sig kunna förutsäga in vivo-korrosivitet på kanin, fastställd enligt testmetod B.4 (2).

DEMONSTRATION AV KOMPETENS

12. Före rutinanvändning av den TER-testmetod för råttthud som är kopplad till den här testmetoden bör laboratorierna visa sin tekniska kompetens genom att korrekt klassificera de tolv kvalifikationsämnen som rekommenderas i tabell 1. När ett listat ämne inte finns tillgängligt eller när det är motiverat kan ett annat ämne som det finns adekvat in vivo- och in vitro-referensdata för (t.ex. från listan över referenskemikalier (16)) användas, förutsatt att samma urvalskriterier tillämpas som de som beskrivs i tabell 1.

Tabell 1: Lista på kvalifikationsämnena¹

Ämne	CAS-nr	Kemisk klass ²	GHS/CLP Kat. baserade på in vivo-resultat ³	VRM Kat. baserade på in vitro-resultat	Fysikaliskt tillstånd	pH ⁴
Frätande ämnen in vivo						
N,N'-dimetyl dipropylentriamin	10563-29-8	Organisk bas	1A	6 × C	L	8,3
1,2-diaminopropan	78-90-0	Organisk bas	1A	6 × C	L	8,3
Svavelsyra (10 %)	7664-93-9	Oorganisk syra	(1A/1B/1C	5 × C 1 × NC	L	1,2
kaliumhydroxid (10 % vattenlösning)	1310-58-3	Oorganisk bas	(1A/1B/1C	6 × C	L	13,2
Oktansyra (kaprylsyra)	124-07-2	Organisk syra	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,6
2-tert-butylfenol	88-18-6	fenol	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,9
Ikke frätande ämnen in vivo						
Isostearinsyra	2724-58-5	Organisk syra	NC	6 × NC	L	3,6
4-amino-1,2,4-triazol	584-13-4	Organisk bas	NC	6 × NC	S	5,5
Fenetyl bromid	103-63-9	Elektrofil	NC	6 × NC	L	3,6
4-(metyltio)-bensaldehyd	3446-89-7	Elektrofil	NC	6 × NC	L	6,8
1,9-dekadien	1647-16-1	Neutral organisk	NC	6 × NC	L	3,9
Tetrakloretylen	127-18-4	Neutral organisk	NC	6 × NC	L	4,5

Förkortningar: aq = vattenbaserad CAS-nr = Chemical Abstracts Service Registry Number VRM = validerad referensmetod ND = Inte fastställt.

¹ Kvalifikationsämnena, som först indelats i frätande respektive icke frätande, sedan i korrosiv underkategori och slutligen efter kemisk klass, valdes ut bland de ämnen som använts i ECVAM:s valideringsstudie av TER-testmetoden på rått hud (8) (9). Om inget annat anges testades ämnena vid den renhetsnivå som de hade när de köptes in från återförsäljaren (8). I den mån detta var möjligt omfattade urvalet ämnen som i) är representativa för graden av korrosiv respons (dvs. icke-korrosiva, och svagt till starkt korrosiva) som kan mätas eller förutses av VRM, ii) är representativa för de kemiska klasser som används i valideringsstudien, iii) återspeglar VRM:s prestandaegenskaper, iv) har väldefinierade kemiska strukturer, v) ger definitiva resultat vid användning av in vivo-referenstestmetoden, vi) finns att köpa i handeln, och vii) inte är belagda med några kostnader för farligt avfall.

² Kemisk klass enligt Barratt m.fl. (8).

³ FN:s motsvarande förpackningsgrupper är I, II respektive III för GHS/CLP-kategorierna 1A, 1B och 1C.

⁴ pH-värdena hämtades från Fentem m.fl. (9) och Barratt m.fl. (8).

FÖRFARANDE

13. Det finns standardiserade tillvägagångssätt (SOP) för TER-testmetoden för hudkorrosion på rått hud (19). TER-testmetoderna för rått hud som omfattas av den här testmetoden ska uppfylla följande villkor:

Djur

14. Råttor ska användas eftersom deras hud har en påvisad känslighet mot kemikalierna i den här testmetoden (12) och eftersom deras hud är den enda hudkällan som har validerats formellt (8) (9). Åldern (då huden tas till vara) och råttstammen är av särskild betydelse för att säkerställa att hårsäckarna är i vilofas innan den vuxna hårtillväxten börjar.
15. Rygg- och flankhår från unga, ungefär 22 dagar gamla han- eller honråttor (erhållna från Wistar eller en jämförbar stam) avlägsnas noggrant med en liten sax. Därefter tvättas djuren noga och torkas sedan omsorgsfullt medan det klippta området hålls ner i antibiotikalösning (som innehåller t.ex. streptomycin, penicillin, kloramfenikol och amfotericin, i koncentrationer som hämmar bakterietillväxt). Djuren tvättas på nytt med antibiotika på tredje eller fjärde dagen efter den första tvätten och används inom tre dagar från den andra tvätten, då hornlagret har återhämtat sig från hårborttagningen.

Beredning av hudbitar

16. Djuren avlivas med en human metod när de är 28–30 dagar gamla. Åldern är av stor betydelse. Huden från rygg och flank från varje djur avlägsnas sedan, och överflödet av underhudsfett skrapas försiktigt bort från huden. Hudbitar med en diameter på ungefär 20 mm tas ut. Hudbitarna kan lagras innan de används om det kan visas att positiva och negativa kontrolldata är likvärdiga med dem som erhålls för färsk hud.
17. Varje hudbit placeras över änden av ett PTFE-rör (polytetrafluoreten) så att överhuden är i kontakt med röret. En o-ring i gummi presspassas över rörets ände för att hålla huden på plats och överflödigt vävnad putsas bort. O-ringen i gummi förseglas sedan till PTFE-rörets ände med vaselin. Röret fästs med en fjäderklämma i en kammare som innehåller MgSO_4 -lösning (154 mM) (figur 1). Hudbiten ska vara helt nedsänkt i MgSO_4 -lösningen. Upp till 10–15 hudbitar kan erhållas från en enda rått hud. Rörets och o-ringens mått visas i figur 2.
18. Innan testningen börjar mäts de båda hudbitarnas elektriska motstånd som ett kvalitetskontrollförfarande för varje djurhud. Båda bitarna ska ge värden för motståndet som är större än 10 k Ω för att återstoden av hudbitarna ska kunna användas för testet. Om motståndet är mindre än 10 k Ω ska återstående hudbitar från den aktuella huden kastas.

Applicering av testkemikalie och kontrollämnen

19. Parallella positiva och negativa kontroller ska användas i varje studie (experiment) för att säkerställa att försöksmodellen fungerar adekvat. Hudbitar från ett enda djur ska användas i varje studie (experiment). Förslag på testkemikalier för positiv och negativ kontroll är 10 M saltsyra respektive destillerat vatten.

20. Testkemikalier i vätskeform (150 µl) appliceras jämnt på huden inuti röret. Vid testning av ämnen i fast form appliceras en tillräcklig mängd för att säkerställa att hela huden täcks av ett jämntjockt skikt. Därefter tillförs avjoniserat vatten (150 µl) på det fasta ämnet, och röret omskakas varsamt. För vissa fasta ämnen kan detta uppnås genom uppvärmning till 30 °C så att testkemikalien smälter eller mjuknar. Alternativt kan ämnet finfördelas till granulat eller pulver.
21. Tre hudbitar ska användas för varje test, och kontrollämnena ska användas i varje studie (experiment). Testkemikalien ska appliceras under 24 timmar vid en temperatur på 20–23 °C. Den tvättas sedan bort med rumstempererat kranvatten tills allt material är avlägsnat.

TER-mätningar

22. Hudens elektriska impedans uttryckt som transkutant elektriskt motstånd (TER) mäts med hjälp av växelström med låg spänning med en Wheatstonebrygga (18). Allmänna tekniska data för bryggan är 1–3 V driftspänning, en sinusformad eller rektangulär växelström på 50–1 000 Hz och ett mätområde på minst 0,1–30 kΩ. Den brygga som användes i valideringsstudien mätte induktans, kapacitans och motstånd upp till värden på 2 000 H, 2 000 µF respektive 2 MΩ vid frekvenser på 100 Hz eller 1 kHz med användning av seriella eller parallella värden. För mätningen av hudkorrosivitet genom TER-bestämning registrerades motståndet vid frekvensen 100 Hz, och seriella värden användes. Före mätning av det elektriska motståndet sänks hudens ytpänning genom tillförsel av etanol (70 %) i tillräcklig mängd för att täcka huden. Etanolen får verka några sekunder och hålls sedan ur röret. Därefter hydreras vävnaden genom tillsats av 3 ml MgSO₄-lösning (154 mM). För motståndsmätningen (kΩ/hudbit) placeras mätutrustningens elektroder på hudbitens motstående båda ytor (figur 1). Elektrodernas mått och elektrodslängden under krokodilklämman framgår av figur 2. Den inre elektrodslämman hålls uppe på PTFE-röret under motståndsmätningen för att säkerställa att elektrodslängden i magnesiumsulfatlösningen (MgSO₄) hålls konstant. Den yttre elektroden placeras innanför receptorkammaren så att elektroden ligger mot kammarens botten. Avståndet mellan fjäderklämman och PTFE-rörets botten ska hållas konstant (figur 2) eftersom avståndet påverkar det erhållna motståndsvärdet. Följaktligen ska avståndet mellan den inre elektroden och hudbiten vara konstant och minimalt (1–2 mm).
23. Om det uppmätta motståndsvärdet överstiger 20 kΩ kan detta bero på att epidermis på hudbiten är täckt av rester av testkemikalien. Man kan försöka att avlägsna denna beläggning genom att tappa till PTFE-röret med tummen (använd handskar) och skaka det i ca 10 sekunder. MgSO₄-lösningen kasseras varpå motståndsmätningen upprepas med färsk MgSO₄-lösning.
24. Såväl testanordningens egenskaper och mått som försöksförfarandet kan påverka de TER-värden som erhålls. Tröskelvärdet på 5 kΩ för hudkorrosion togs fram utifrån data som erhållits med den specifika anordning och det specifika förfarande som beskrivs för denna metod. Andra tröskelvärden och kontrollvärden kan gälla om testbetingelserna ändras eller om en annan testanordning används. Därför måste metoden och tröskelvärdena för motstånd kalibreras genom tester av ett antal kvalifikationsämnen som väljs bland de ämnen som användes i valideringsstudien (8) (9) eller från liknande kemiska klasser som de kemikalier som undersöks. Ett antal lämpliga kvalifikationsämnen anges i tabell 1.

Metoder som bygger på färgämnesbindning

25. Exponering för vissa icke-korrosiva material kan sänka motståndet under tröskelvärde 5 k Ω så att joner kan flöda genom hornlagret då det elektriska motståndet minskar (9). Exempelvis kan neutrala organiska ämnen och ämnen med ytaktiva egenskaper (t.ex. detergenter, emulgeringsmedel och andra ytaktiva ämnen) avlägsna lipider från huden och därmed göra barriären mer permeabel för joner. Om de TER-värden som kemikalierna ger upphov till är lägre än eller omkring 5 k Ω och det inte finns några synliga skador på hudbitarna bör en bedömning av färgämnespenetrationen göras i kontrollvävnad och behandlad vävnad för att fastställa om de erhållna TER-värdena är en följd av ökad hudpermeabilitet eller av hudkorrosion (7) (9). Om hudkorrosion föreligger och hornlagret är skadat kommer färgämnet sulforhodamin B snabbt att tränga igenom hudytan och färga underliggande vävnad då det appliceras. Detta färgämne är stabilt mot ett brett urval av kemikalier och påverkas inte av det extraktionsförfarande som beskrivs nedan.

Applicering och avlägsnande av färgämnet sulforhodamin B

26. Efter TER-testet hålls magnesiumsulfatet bort från röret, och huden granskas noga med avseende på synlig skada. Vid avsaknad av tydlig större skada (dvs. perforering) ska 150 μ l av en 10 % (w/v) lösning av färgämnet sulforhodamin B i destillerat vatten (röd syra 52, C.I. 45100, CAS-nummer 3520-42-1) appliceras på varje hudbit i två timmar. Därefter avlägsnas överskott (obundet färgämne) genom tvättning av hudbitarna med kranvattenstråle (upp till rumstemperatur) i ungefär 10 sekunder. Varje hudbit tas försiktigt ut ur PTFE-röret och placeras i en burk (t.ex. en 20-ml scintillationsburk av glas) som innehåller avjoniserat vatten (8 ml). Burkarna skakas varsamt i fem minuter för att avlägsna eventuella obundna färgrester. Därefter upprepas sköljningen. Hudbitarna tas bort, placeras i burkar som innehåller 5 ml 30-procentig (vikt i volym) natriumdodecylsulfat (SDS) i destillerat vatten och inkuberas över natten vid 60 °C.
27. Efter inkubationen avlägsnas hudbitarna och slängs, och den kvarvarande lösningen centrifugeras under 8 minuter vid 21 °C (relativ centrifugalkraft $\sim 175 \times g$). Ett 1 ml prov av supernatanten späds ut i volymförhållandet 1:5 (dvs. 1 ml + 4 ml) med 30-procentig (vikt i volym) SDS i destillerat vatten. Lösningens optiska densitet (OD) mäts vid 565 nm.

Beräkning av färgämneshalten

28. Halten av sulforhodamin B per hudbit beräknas utifrån OD-värdena (9) (färgämnets molära extinktionskoefficient vid 565 nm = $8,7 \times 10^4$ molekyylvikt = 580). Färgämneshalten bestäms för varje hudbit med hjälp av en lämplig kalibreringskurva, och därefter beräknas replikatens medelhalt.

Acceptanskriterier

29. TER-medelvärdena godtas om parallella positiva och negativa kontrollvärden faller inom de godtagbara intervallen för den metod som används på testlaboratoriet. De godtagbara motståndsintervallen för metoden och anordningen som beskrivs ovan anges i följande tabell:

Kontroll	Ämne	Motståndsintervall (kΩ)
Positivt	10M saltsyra	0,5–1,0
Negativt	Destillerat vatten	10–25

30. Medelhalterna för färgämnesbindning godtas på villkor att värdena för de parallella kontrollerna ligger inom de godtagbara intervallen för metoden. Föreslagna intervall för färgämneshalt för kontrollämnena för den metod och den apparatur som beskrivs ovan anges i följande tabell:

Kontroll	Ämne	Intervall för färgämneshalt (µg/hudbit)
Positivt	10M saltsyra	40–100
Negativt	Destillerat vatten	15–35

Tolkning av resultaten

31. Det erhållna TER-värdet som skiljer korrosiva testkemikalier från icke-korrosiva fastställdes vid optimeringen av testmetoden, testades under en förvalideringsfas och bekräftades i en formell valideringsstudie.
32. Prediktionsmodellen för TER-metoden för korrosion på rått hud (9) (19) i GHS/CLP-klassificeringssystemet anges nedan:

Testkemikalien anses vara icke-korrosiv för huden

- i) om dess genomsnittliga TER-värde överstiger ($>$) 5 kΩ, eller
- ii) om dess genomsnittliga TER-värde är högst ($\leq$) 5 kΩ, och
- hudbitarna inte uppvisar några tydliga skador (dvs. perforering), och
- det genomsnittliga färginnehållet på hudbitarna är mindre än ($<$) medelhalten av färgämne i den parallella positiva kontroll som behandlats med 10 M HCl (se punkt 30 för positiva värden).

Testkemikalien anses vara korrosiv för huden

- i) om dess genomsnittliga TER-värde är högst ($\leq$) 5 kΩ och hudbitarna uppvisar tydliga skador (t.ex. är perforerade), eller
- ii) om dess genomsnittliga TER-värde är högst ($\leq$) 5 kΩ, och
- hudbitarna inte uppvisar några tydliga skador (dvs. perforering), men
- medelhalten av färgämne är större än eller lika hög som ($\geq$) medelhalten av färgämne i den parallella positiva kontroll som behandlats med 10 M HCl (se punkt 30 för positiva kontrollvärden).

33. En enda testomgång med minst tre hudbitsreplikater bör vara tillräcklig för en testkemikalie förutsatt att den resulterande klassificeringen är otvetydig. I fall av gränsresultat, såsom icke-konkordanta mätningar av replikaten och/eller genomsnittliga TER-värden motsvarande $5 \pm$

0,5 %, bör man överväga en andra oberoende testomgång (experiment), och även en tredje omgång om resultaten mellan de två första omgångarna (experimenten) är diskordanta.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

34. Motståndsvärden ($k\Omega$) och medelhalter av färgämne ($\mu\text{g}/\text{hudbit}$) ska där det lämpar sig för testkemikalien, liksom för positiva och negativa kontroller, rapporteras i tabellform, inbegripet data för varje enskilt replikat i varje testomgång (experiment) och genomsnittliga värden $\pm$ SD. Alla upprepade experiment ska rapporteras. Förekomsten av skador på hudbitarna ska rapporteras för varje testkemikalie.

Testrapport

35. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie och kontrollämnen:

- Monokomponentämne: kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.
- Multikomponentämne, UVCB och blandningar: Dessa karakteriseras så långt som möjligt genom kemisk beteckning (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.
- Fysikaliskt tillstånd, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.
- Ursprung, satsnummer om sådant finns.
- Eventuell behandling av testkemikalien/kontrollämnet före testning (t.ex. uppvärmning, malning).
- Testkemikaliens stabilitet, sista förbrukningsdatum eller sista datum för upprepad analys, om känt.
- Lagringsförhållanden.

Försöksdjur:

- Stam och kön för använda djur.
- Djurens ålder då de användes som donatordjur.
- Ursprung, uppfödningförhållanden, diet etc.
- Uppgifter om hudberedningen.

Testbetingelser:

- Kalibreringskurvor för testanordningen.

- Kalibreringskurvor för utförande av färgämnesbindning, bandpassen som använts för mätning av OD-värden samt det linjära OD-intervallet för mätningssinstrumenten (dvs. spektrofotometer), i förekommande fall.
- Uppgifter om testförfarandet för TER-mätningar.
- Uppgifter om testförfarandet för bestämning av färgämnesbindning, om detta är tillämpligt.
- De testdoser som använts, exponeringstid och exponeringstemperatur(er).
- Detaljer för tvättningsförfarandet efter exponering.
- Antal hudbitsreplikater som använts per testkemikalie och kontroll (positiva och negativa).
- Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet.
- Hänvisning till historiska uppgifter om modellen. Dessa ska omfatta, men inte vara begränsade till, följande:
 - i) Uppgifter om huruvida de positiva och negativa TER-kontrollvärdena är godtagbara med avseende på positiva och negativa intervall för kontrollernas motstånd.
 - ii) Uppgifter om huruvida de positiva och negativa kontrollvärdena för färginnehåll (mätt i $\mu\text{g}/\text{hudbit}$) är godtagbara med avseende på positiva och negativa intervall för kontrollernas färgämneshalt.
 - iii) Uppgifter om huruvida testresultaten är godtagbara med avseende på historisk variabilitet mellan hudbitsreplikater.
- Beskrivning av beslutskriterierna/den prediktionsmodell som använts.

Resultat:

- Redovisning i tabellform av uppgifterna från TER- och färgbindningstesten (i förekommande fall) för varje enskild testkemikalie och kontroll, för varje testomgång (experiment) och för varje hudbitsreplikater (enskilda prover av djur- och människohud), medelvärden, SD-värden och CV-värden.
- Beskrivning av observerade effekter.
- Härledda klassificeringar med hänvisning till förekommande prediktionsmodell/beslutskriterier.

Diskussion av resultaten

Slutsatser

LITTERATURHÄNVISNINGAR

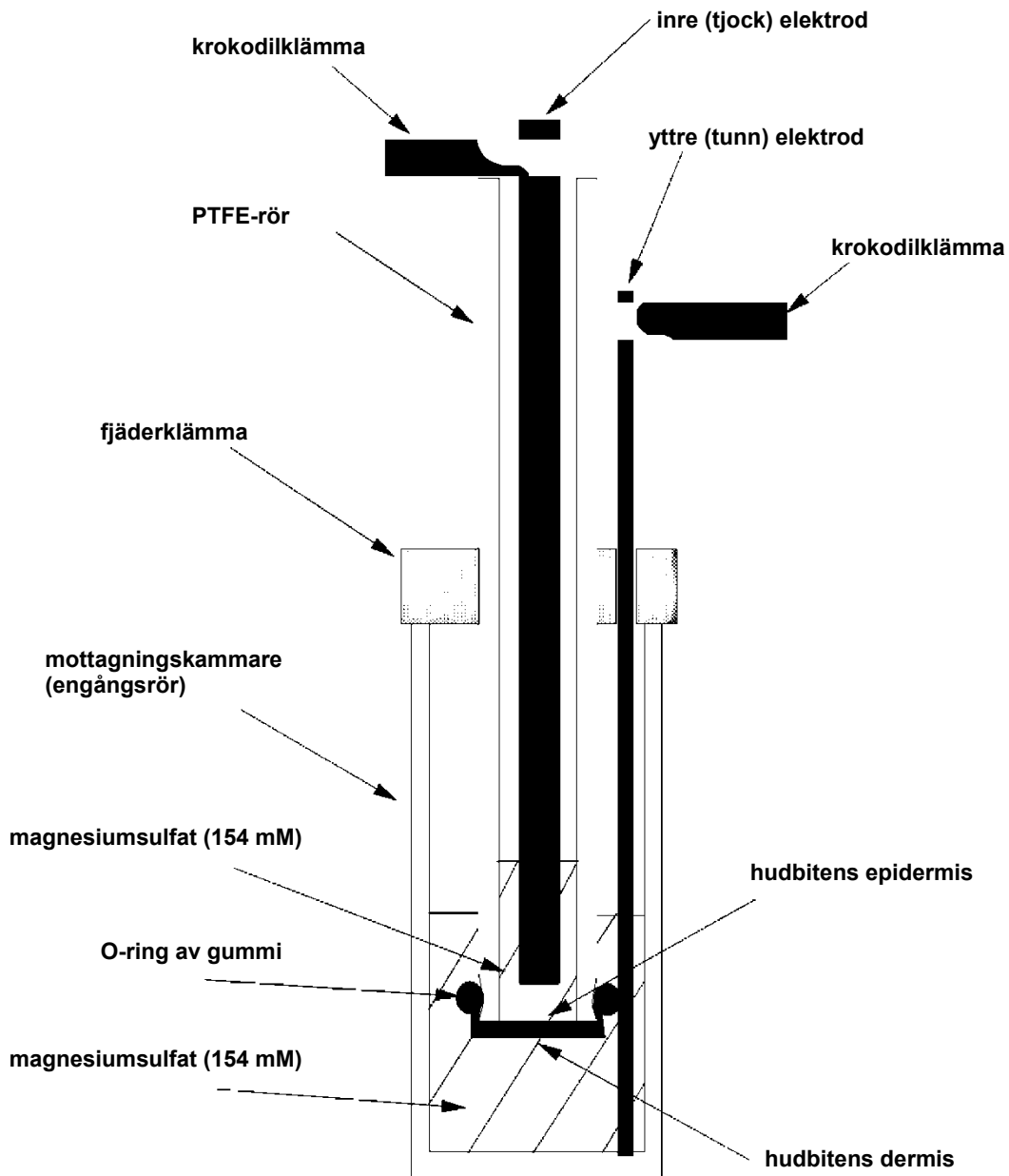
- (1) Förenta nationerna (FN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), andra reviderade utgåvan, FN New York och Genève, 2013. Tillgänglig på: [\[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html\]](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html).
- (2) Kapitel B.4 i denna bilaga, Akut hudirritation/hudkorrosion.
- (3) Kapitel B.40a i denna bilaga, Hudkorrosion in vitro.
- (4) Kapitel B.65 i denna bilaga, In vitro-membranbarriärtest för hudkorrosion.
- (5) Kapitel B.46 i denna bilaga, Hudirritation in vitro: Testmetod med rekonstruerad human epidermis.
- (6) OECD (2014). Vägledningsdokument om ett integrerat synsätt på testning och bedömning av hudirritation/hudkorrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 203, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (7) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponc, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. och Balls, M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6 *ATLA* 23, s. 219–255.
- (8) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., och Worth, A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, s. 471–482.
- (9) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. och Liebsch, M (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro* 12, s. 483–524.
- (10) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., och Zucco, F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops. *ATLA* 23, s. 129–147.
- (11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of

- Toxicological Test Methods. NIH Publication nr 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.
 - (13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, s. 275–280.
 - (14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication nr 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
 - (15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 218. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
 - (16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., och Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test – Modifications and Validation. *Fd. Chem. Toxicol.* 24, s. 507–512.
 - (17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., och Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro*: Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol. In Vitro* 6, 191-194.
 - (18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüscheweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. och Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 62, s. 393–403.
 - (19) TER SOP (december 2008). *INVITTOX* Protocol (nr 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.
 - (20) OECD (2005). Vägledningsdokument för validering och internationellt godkännande av nya och uppdaterade testmetoder för riskbedömning.

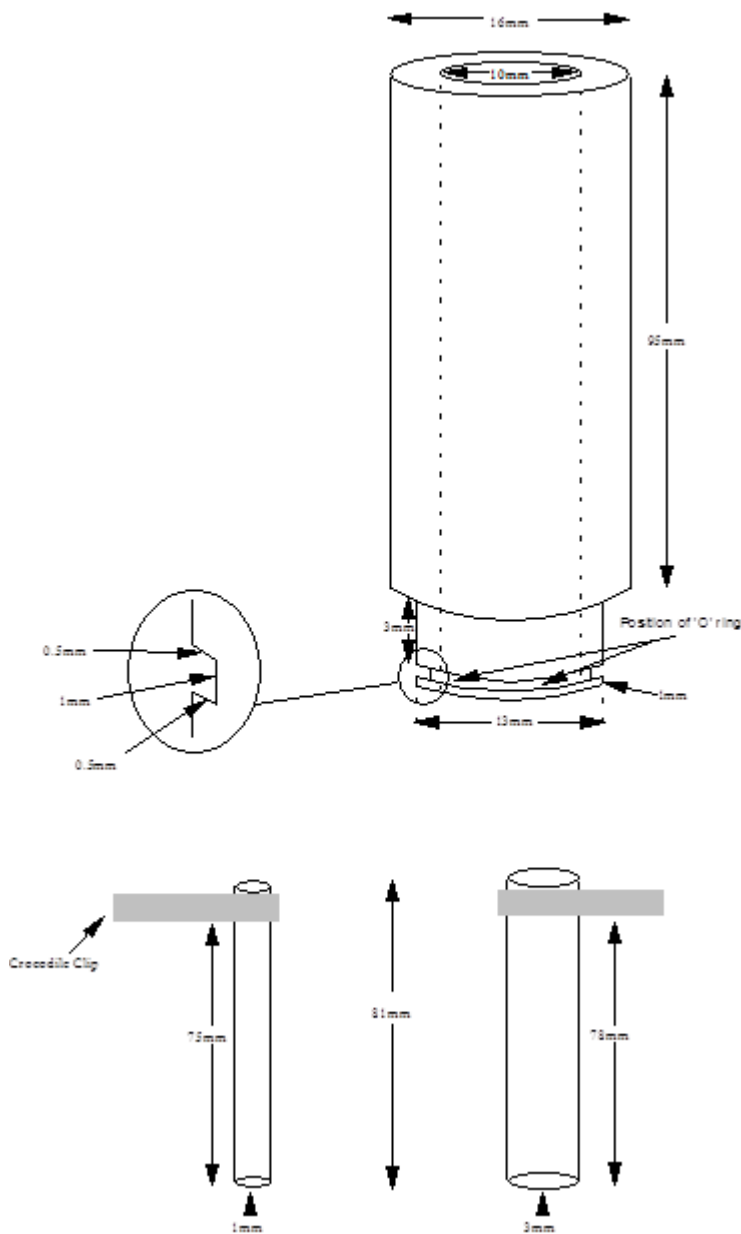
Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment
nr 34, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

FIGUR 1: ANORDNING FÖR TER-ANALYS AV RÅTTHUD

FIGUR 1: ANORDNING FÖR TER-ANALYS AV RÅTTHUD



FIGUR 2: MÅTT PÅ POLYTETRAFLUORETENRÖR (PTFE-RÖR), MOTTAGARRÖR OCH ELEKTRODER



Kritiska faktorer för den anordning som visas ovan:

- PTFE-rörets innerdiameter.
- Elektrodernas längd jämfört med PTFE-rörets och mottagarrörets. Hudbiten ska inte vara i kontakt med elektroderna, och en standardlängd av elektroden ska vara i kontakt med MgSO_4 -lösningen.
- Mängden MgSO_4 -lösning i mottagarröret ska ge ett visst djup i vätskan jämfört med nivån i PTFE-röret, såsom visas i figur 1.

- Hudbiten ska vara ordentligt fäst vid PTFE-röret, så att det elektriska motståndet är ett verkligt mått på hudens egenskaper.

Tillägg

DEFINITIONER

Noggrannhet: Ett mått på hur testmetodens resultat överensstämmer med de godtagna referensvärdena. Exakthet är ett mått på testmetodens prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (20).

C: korrosiv.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Konkordans: ett mått på testmetodens prestanda för sådana testmetoder som ger kategoriska resultat, och relevansaspekt. Termen används ibland omväxlande med exakthet och definieras som andelen av alla testade kemikalier som klassificeras korrekt som positiva eller negativa. Konkordansen är direkt beroende av förekomsten av positiva värden i den testkemikalie som undersöks (20).

GHS (globalt harmoniserat system för klassificering och märkning av kemikalier): ett system för att klassificera kemikalier (ämnena och blandningar) enligt standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker, och informera om resultaten genom t.ex. piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad i syfte att informera om kemikaliernas skadliga effekter för att skydda personer (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) samt miljön (1).

IATA: ett integrerat synsätt på testning och bedömning.

Blandning: blandning eller lösning som består av två eller flera ämnen.

Monokomponentämne: ett ämne, definierat av sin kvantitativa sammansättning, där en huvudsaklig beståndsdel utgör minst 80 viktprocent.

Multikomponentämne: ett ämne, definierat av sin kvantitativa sammansättning, där mer än en huvudsaklig beståndsdel förekommer i en koncentration på ≥ 10 viktprocent och < 80 viktprocent. Ett multikomponentämne är resultatet av en tillverkningsprocess. Skillnaden mellan blandningar och multikomponentämnen är att en blandning erhålls genom att två eller flera ämnen blandas utan kemisk reaktion. Ett multikomponentämne är resultatet av en kemisk reaktion.

NC: icke-korrosiv.

OD: optisk densitet.

PC: positiv kontroll, ett replikat som innehåller ett testsystems alla komponenter och som behandlats med ett ämne som man vet ger positiv respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsens variationer kan bedömas över tid, bör den kraftiga irritation som framkallas inte vara överdriven.

Prestandastandarder (PS): standarder som baseras på en validerad testmetod och som utgör grunden för utvärdering av jämförbarheten för en föreslagen testmetod som är mekaniskt och funktionellt likartad. Följande ingår: i) testmetodens grundläggande komponenter, ii) en minimiförteckning med referenskemikalier som valts ut bland de kemikalier som använts för att påvisa att den validerade testmetoden fungerar tillfredsställande, och iii) de jämförbara nivåer av exakthet och tillförlitlighet, på grundval av vad som erhållits för den validerade testmetoden, som man bör kunna påvisa för den föreslagna testmetoden när den utvärderas med användning av minimiförteckningen med referenskemikalier.

Relevans: beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida detta förhållande är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl man genom testet korrekt kan mäta och förutse den biologiska effekt det gäller. Relevans omfattar också överväganden om en testmetods noggrannhet (konkordans) (20).

Tillförlitlighet: mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tid när den utförs med hjälp av samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier (20).

Sensitivitet: den andel av alla positiva/aktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testet. Sensitiviteten är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (20).

Hudkorrosion in vivo: en irreversibel skada på huden i form av synlig nekros genom epidermis och in i dermis, efter applicering av en testkemikalie i upp till fyra timmar. Korrosiva reaktioner karakteriseras av sår, blödning, blodiga sårskorpor och, vid slutet av observationsperioden på 14 dagar, avfärgning genom blekning av huden, hela områden med alopeci (håravfall) och ärr. Histopatologi bör övervägas för att bedöma tveksamma skador.

Specificitet: den andel av alla negativa/inaktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testet. Specificiteten är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (20).

Ämne: kemiskt grundämne och föreningar av detta grundämne i naturlig eller tillverkad form, inklusive de eventuella tillsatser som är nödvändiga för att bevara dess stabilitet och sådana föroreningar som härrör från tillverkningsprocessen, men exklusive eventuella lösningsmedel som kan avskiljas utan att det påverkar ämnets stabilitet eller ändrar dess sammansättning.

(Test)omgång: parallell testning av en enskild testkemikalie på minst tre hudbitsreplikater.

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

Transkutant elektriskt motstånd (TER): ett mått på hudens elektriska impedans, uttryckt som ett motståndsvärde i kΩ. Det är en enkel och robust metod för att bedöma hudens barriärfunktion genom att registrera jonflödet genom huden med en Wheatstonebrygga.

UVCB-ämne: ämne med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiskt material. ”

6) I del B ska kapitel B.40a ersättas med följande:

”B.40a HUDKORROSION IN VITRO: TESTMETOD MED REKONSTRUERAD HUMAN EPIDERMIS (RhE)

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 431 (2016). Hudkorrosion innebär att det uppstår en irreversibel skada på huden i form av synlig nekros genom epidermis och in i dermis, efter applicering av en testkemikalie (enligt definitionen i Förenta nationernas globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (1) och Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP-förordningen)¹). Denna uppdaterade testmetod B.40a är en in vitro-metod för att identifiera icke-korrosiva och korrosiva ämnen och blandningar i enlighet med GHS och CLP. Den möjliggör också en partiell underkategorisering av korrosiva ämnen.
2. Bedömningen av kemikaliers potential för hudkorrosion har i regel inneburit användning av försöksdjur (TM B.4, likvärdig med OECD TG 404, ursprungligen antagen 1981, reviderad 1992, 2002 och 2015) (2). Utöver den nuvarande testmetoden TM B.40a har två andra in vitro-testmetoder för bedömning av kemikaliers potential att orsaka hudkorrosion validerats och antagits: TM B.40 (likvärdig med OECD TG 430) (3) och TM B.65 (likvärdig med OECD TG 435) (4). Dessutom har in vitro-metoden TM B.46 (likvärdig med OECD TG 439) (5) antagits för att testa hudirriterande potential. I OECD:s vägledningsdokument om ett integrerat synsätt på testning och bedömning (IATA) av hudkorrosion och hudirritation beskrivs flera moduler som grupperar olika informationskällor och analysverktyg, och där det ges i) vägledning om hur tillgängliga testdata och icke testdata kan integreras och användas i bedömningen av kemikaliers potential för hudirritation och hudkorrosion och ii) förslag på hur man ska gå till väga när det krävs ytterligare testning (6).
3. Denna testmetod gäller endpointen hudkorrosion hos människa. Den använder sig av rekonstruerad human epidermis (RhE) (framtagen från icke-transformerade epidermala keratinocyter från människa) som histologiskt, morfologiskt, biokemiskt och fysiologiskt nära efterliknar den mänskliga hudens översta del (epidermis). Den motsvarande OECD-testriktlinjen antogs ursprungligen 2004 och uppdaterades dels 2013, för att inkludera ytterligare testmetoder som använder sig av RhE-modeller och möjliggöra användning av metoder som stöder underkategorisering av korrosiva kemikalier, dels 2015, för att ta med

¹ 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).

hänvisningar till vägledningsdokumentet om IATA och introducera ett alternativt förfarande för mätning av viabilitet.

4. Denna testmetod omfattar fyra validerade RhE-modeller som finns tillgängliga på marknaden. Förvalideringsstudier (7) följda av en formell valideringsstudie för bedömning av hudkorrosion (8) (9) (10) har genomförts (11) (12) för två av dessa testmodeller som finns tillgängliga på marknaden, nämligen EpiSkin™ Standard Model (SM) och EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (nedan kallade *validerade referensmetoder* (VRM)). Utifrån resultaten av dessa studier rekommenderas användning av de två ovannämnda VRM för lagstadgade ändamål när korrosiva ämnen (C) ska skiljas från icke-korrosiva ämnen (NC), och EpiSkin™ rekommenderas dessutom som ett stöd vid underkategorisering av korrosiva ämnen (13) (14) (15). Enligt PS-baserad validering (16) (17) (18) har de två andra in vitro-RhE-testmodellerna för hudkorrosion som finns tillgängliga på marknaden uppvisat liknande resultat som den validerade referensmetoden EpiDerm™. Dessa är SkinEthic™ RHE¹ och epiCS® (tidigare kallad EST-1000), och de kan också användas för lagstadgade ändamål i syfte att skilja korrosiva ämnen från icke-korrosiva (19) (20). Under perioden 2012–2014 har tillverkarna av RhE-modeller genomfört uppföljande valideringsstudier med ett förbättrat protokoll och därmed kunnat korrigera interferens från icke-specifik MTT-reduktion av testkemikalier samt förbättra prestandan både vad gäller särskiljande av C/NC och underkategorisering av korrosiva ämnen (21) (22). Ytterligare statistiska analyser av data från de uppföljande valideringsstudierna av EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE och epiCS® har genomförts i syfte att identifiera alternativa prediktionsmodeller som förbättrar prediktionskapaciteten för underkategorisering (23).
5. Innan en föreslagen liknande eller modifierad in vitro-RhE-testmetod för hudkorrosion som inte är en VRM kan användas för lagstadgade ändamål bör dess tillförlitlighet, relevans (noggrannhet) och begränsningar för det valda syftet bedömas i syfte att garantera att metoden motsvarar VRM, i enlighet med kraven i prestandastandarderna (PS) (24) som fastställts i enlighet med principerna i OECD:s vägledningsdokument nr 34 (25). Ömsesidig dataacceptans kan endast garanteras efter att eventuella föreslagna testmetoder, nya eller uppdaterade, som följer PS har granskats och inkluderats i motsvarande testriktlinjer. De testmodeller som inkluderas i testriktlinjerna kan användas i enskilda länder för att möta ländernas krav på testresultat gällande in vitro-testmetoder för hudkorrosion, tack vare den ömsesidiga dataacceptansen.

¹ Förkortningen RhE (= rekonstruerad human epidermis) används för alla modeller som baseras på RhE-teknik. När förkortningen RHE används tillsammans med SkinEthic™-modellen betyder den samma sak, dock skrivs den ut med bara stora bokstäver när den ingår i den specifika testmetodens kommersiella namn.

DEFINITIONER

6. Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

7. Den här testmetoden möjliggör identifiering av frätande och icke frätande ämnen och blandningar i enlighet med GHS och CLP. Den stöder dessutom indelning av korrosiva ämnen och blandningar i en valfri underkategori 1A, i enlighet med GHS (1), liksom i en kombination av underkategorierna 1B och 1C (21) (22) (23). En begränsning med den här testmetoden är att den inte särskiljer mellan underkategori 1B respektive 1C för hudkorrosion enligt GHS och CLP på grund av sin begränsade uppsättning av välkända kemikalier för in vivo-underkategori 1C för korrosiva ämnen. Testmodellerna EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE och epiCS® kan användas för underkategorisering (dvs. mellan 1A och 1B respektive 1C och NC).
8. En stor mängd kemikalier, främst enskilda ämnen, har testats för att validera de testmodeller som ingår i den här testmetoden gällande identifiering av icke- korrosiva och korrosiva ämnen. I den empiriska databasen från valideringsstudien ingår 60 kemikalier från flera olika kemiska klasser (8) (9) (10). Utvecklarna av testmetoden har genomfört test för att visa underkategoriseringens sensitivitet, specificitet, noggrannhet och reproducerbarhet inom laboratoriet, och resultaten från dessa test har granskats av OECD (21) (22) (23). Utifrån de samlade data som finns tillgängliga är testmetoden tillämplig på en mängd olika kemiska klasser och fysikaliska tillstånd, inklusive vätskor, halvfasta ämnen, fasta ämnen och vaxer. Vätskorna kan vara vattenbaserade eller inte. Fasta ämnen kan vara vattenlösliga eller icke-vattenlösliga. Fasta ämnen ska alltid när det är möjligt malas ned till fint pulver före appliceringen, och ingen annan beredning behövs. Om det finns bevis för att en testmodell som ingår i den här testmetoden inte är tillämplig på en specifik kategori av testkemikalier bör den inte användas för denna kategori. Eftersom denna testmetod är applicerbar på substanser anses den även kunna användas för blandningar. Med tanke på att blandningar omfattar en stor mängd kategorier och sammansättningar och det i nuläget endast finns begränsad information om testning av blandningar bör dock testmetoden inte användas på blandningskategorier för vilka den har visat sig vara icke-applicerbar (dvs. enligt den strategi som föreslås i (26)) ska testmetoden då inte användas för denna specifika kategori av blandningar. Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag. Gaser och aerosoler har ännu inte bedömts genom valideringsstudier (8) (9) (10). Det är tänkbart att de kan testas med RhE-teknik, men den aktuella testmetoden ger inte möjlighet att testa gaser och aerosoler.
9. Testkemikalier som absorberar ljus i samma våglängdsområde som MTT-formazan och testkemikalier som direkt kan reducera vitalfärgämnet MTT (till MTT-formazan) kan störa mätningarna av vävnadens viabilitet och göra det nödvändigt att använda anpassade kontroller för korrigeringar. Vilken typ av anpassade kontroller som krävs beror på vilken typ av

interferens som skapas av testkemikalien samt vilken procedur som används för att mäta MTT-formazan (se punkterna 25–31).

10. Denna testmetod ger visserligen inte adekvat information om hudirritation, men det bör nämnas att TM B.46 är särskilt avsedd att testa hälsoeffekten hudirritation in vitro och att den är baserad på samma RhE-testsystem även om den använder ett annat protokoll (5). För en fullständig bedömning av lokala effekter på huden efter en enstaka dermal exponering, se OECD:s vägledningsdokument om IATA (6). Denna IATA-strategi inbegriper utförande av in vitro-tester av hudkorrosion (enligt beskrivningen i den här testmetoden) och hudirritation innan tester på levande djur övervägs. Användningen av human hud är föremål för nationella och internationella etiska överväganden och begränsningar.

TESTPRINCIP

11. Testkemikalien appliceras lokalt på en tredimensionell RhE-modell bestående av icke-transformerade epidermala keratinocyter från människa, vilka har odlats till att bilda en flerskiktad och starkt differentierad modell av human epidermis. Den består av ordnade skikt i form av basallager, taggcellslager och granulärt lager samt ett flerskiktat hornlager innehållande intercellulära lamellära lipidlager av de huvudsakliga lipidklasser som motsvarar dem som förekommer in vivo.
12. Principen för bestämningen följer hypotesen om att kemikalier är korrosiva om de kan penetrera hornlagret genom diffusion eller erosion och är tillräckligt cytotoxiska för att orsaka celldöd i underliggande cellskikt. Cellviabiliteten mäts genom enzymatisk omvandling av vitalfärgämnet MTT [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid, tiazolylblått-tetrazoliumbromid, CAS-nummer 298-93-1], till ett blått formazansalt som mäts kvantitativt efter att det har extraherats från vävnaderna (27). Irriterande kemikalier identifieras genom deras förmåga att minska cellviabiliteten under definierade gränsvärden (se punkterna 35 och 36). Den RhE-baserade testmetoden för hudkorrosion har visat sig vara prediktiv för in vivo-effekter på kaninhud, enligt TM B.4 (2).

DEMONSTRATION AV KOMPETENS

13. Före rutinanvändning av någon av de validerade RhE-testmodellerna i denna testmetod bör laboratoriet visa sin tekniska förmåga genom att korrekt klassificera de tolv kvalifikationsämnen som listas i tabell 1. Om en metod för underkategorisering ska användas bör det även visa en korrekt underkategorisering. När ett listat ämne inte finns tillgängligt eller när det är motiverat kan ett annat ämne som det finns adekvat in vivo- och in vitro-referensdata för (t.ex. från listan över referenskemikalier (24)) användas, förutsatt att samma urvalskriterier tillämpas som de som beskrivs i tabell 1.

Tabell 1: Lista på kvalifikationsämnen¹

Ämne	CAS-nr	Kemisk klass ²	GHS/CLP-kategori baserat på in vivo-resultat ³	VRM Kat. baserat på In vitro-resultat ⁴	MTT Reducerare ⁵	Fysiskt tillstånd
Underkategori 1A korrosiva ämnen in vivo						
Bromättiksyra	79-08-3	Organisk syra	1A	(3) 1A	--	S
Bortrifluoridihydrat	13319-75-0	Oorganisk syra	1A	(3) 1A	--	L
Fenol	108-95-2	Fenol	1A	(3) 1A	--	S
Dikloroacetyl-klorid	79-36-7	Elektrofil	1A	(3) 1A	--	L
Kombination av underkategorierna 1B och 1C för korrosiva ämnen in vivo						
Monohydratisk glyoxylsyra	563-96-2	Organisk syra	1B och 1C	(3) 1B och 1C	--	S
Mjölksyra	598-82-3	Organisk syra	1B och 1C	(3) 1B och 1C	--	L
Etanolamin	141-43-5	Organisk bas	1B	(3) 1B och 1C	Y	Trögflytande
Saltsyra (14,4 %)	7647-01-0	Oorganisk syra	1B och 1C	(3) 1B och 1C	--	L
Ikke-korrosiva ämnen in vivo						
Fenetylbromid	103-63-9	Elektrofil	NC	(3) NC	Y	L
4-amino-1,2,4-triazol	584-13-4	Organisk bas	NC	(3) NC	--	S
4-(metyltio)-bensaldehyd	3446-89-7	Elektrofil	NC	(3) NC	Y	L
Laurinsyra	143-07-7	Organisk syra	NC	(3) NC	--	S

Förkortningar: CAS-nr = Chemical Abstracts Service Registry Number VRM = validerad referensmetod NC = Ikke-korrosivt ämne

¹ Kvalifikationsämnen, som först har delats in i korrosiva respektive icke-korrosiva, sedan efter korrosiv underkategori och slutligen efter kemisk klass, har valts ut från de ämnen som använts i ECVAM:s valideringsstudier för EpiSkin™ och EpiDerm™ (8) (9) (10) samt från uppföljande valideringsstudier baserade på data som tillhandahållits av utvecklarna av EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ respektive epiCS® (23). Om inget annat anges så har ämnena testas på den renhetsnivå som de hade vid inköp (8) (10). I den mån detta var möjligt omfattade urvalet kemikalier som i) är representativa för graden av korrosiv respons (dvs. icke-korrosiva, och svagt till starkt korrosiva) som kan mätas eller förutses av VRM, ii) är representativa för de kemiska klasser som används i valideringsstudien, iii) har väl definierade kemiska strukturer, iv) ger resultat i VRM som är möjliga att reproducera, v) ger definitiva resultat vid användning av in vivo-referenstestmetoden, vi) finns att köpa i handeln, och vii) inte är belagda med några kostnader för farligt avfall.

² Kemisk klass enligt Barratt m.fl. (8).

³ FN:s motsvarande förpackningsgrupper är I, II eller III, för GHS/CLP-kategorierna 1B, 1C och 1C.

⁴ De VRM för in vitro-prediktion som redovisas i denna tabell erhöles genom användning av EpiSkin™ respektive EpiDerm™ testmodeller (VRM) genom uppföljande valideringsförsök som genomfördes av testmetodutvecklarna.

⁵ Viabilitetsvärdena som erhöles i ECVAM:s valideringsstudier för hudkorrosion har inte korrigerats för MTT-reduktion (inga dödade kontroller genomfördes inom ramen för valideringsstudierna). Däremot användes anpassade kontroller vid framtagningen av testmetodutvecklarnas valideringsdata som presenteras i den här tabellen (23).

14. Som en del av kvalitetsförfarandet rekommenderas att användarna efter mottagande av vävnaden verifierar dess barriäregenskaper enligt specifikationerna från RhE-modelltillverkaren. Detta är särskilt viktigt om vävnader transporteras över långa sträckor eller om transporten tar lång tid. När en metod har etablerats på ett framgångsrikt sätt och kvaliteten hos metodanvändningen har påvisats, behöver sådana verifikationer inte göras rutinmässigt. När en metod används rutinmässigt rekommenderas dock att bedömningen av barriäregenskaperna görs med jämna mellanrum.

FÖRFARANDE

15. Nedan följer en generisk beskrivning av komponenterna och procedurerna i de RhE-testmodeller för bedömning av hudkorrosion som ingår i denna testmetod. De RhE-modeller som anses vetenskapligt giltiga för att användas inom denna testmetod, dvs. EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE och epiCS® modellerna (16) (17) (19) (28) (29) (30) (31) (32) (33), finns tillgängliga i handeln. Det finns standardiserade tillvägagångssätt (SOP) för dessa fyra RhE-modeller (34) (35) (36) (37), och deras huvudsakliga testmetodkomponenter sammanfattas i tillägg 2. Vid implementering och användning av en av dessa modeller i laboratoriet bör de SOP som är relevanta i sammanhanget konsulteras. Testning med de fyra RhE-modeller som omfattas av den här testmetoden ska uppfylla följande villkor:

RHE-TESTMETOD, KOMPONENTER

Allmänna betingelser

16. Icke-transformerade humana keratinocyter ska användas för rekonstruktion av epitelvävnaden. Flera lager av viabla epitelceller (basallager, taggcellslager och granulärt lager) ska finnas under ett funktionellt hornlager. Hornlagret ska bestå av flera skikt och innehålla den lipidprofil som krävs för att ge en funktionell barriär som är tillräckligt robust för att stå emot snabb penetrering av cytotoxiska markörer (t.ex. natriumdodecylsulfat eller Triton X-100). Barriärfunktionen bör påvisas och kan bedömas antingen genom bestämning av den koncentration vid vilken markören minskar vävnadernas viabilitet med 50 % (IC₅₀) efter en fast exponeringstid eller genom att bestämma den exponeringstid som krävs för att minska cellviabiliteten med 50 % (ET₅₀) vid applicering av en viss fastställd koncentration av markören (se punkt 18). RhE-modellens inneslutningsegenskaper ska förhindra att material kan passera runt hornlagret till den viabla vävnaden, vilket kan leda till en bristande modellering av hudexponeringen. RhE-modellen får inte vara kontaminerad med bakterier, virus, mykoplasma eller svamp.

Funktionella betingelser

Viabilitet

17. För kvantifiering av vävnadens viabilitet används MTT-testet (27). De viabla cellerna i den konstruerade RhE-vävnaden reducerar vitalfärgämnet MTT till en fällning av blått MTT-

formazan, som därefter extraheras från vävnaden med hjälp av isopropanol (eller ett liknande lösningsmedel). Extraktionsmedlets optiska densitet (OD) bör vara tillräcklig låg, dvs. $< 0,1$. Det extraherade MTT-formazanet kan kvantifieras antingen med hjälp av ett standardmätningssinstrument för absorbering (OD) eller genom ett förfarande med HPLC/UPLC-spektrofotometer (38). Användare av RhE-modellen bör se till att varje sats som används uppfyller de definierade kriterierna för den negativa kontrollen. RhE-modellens utvecklare/återförsäljare ska fastställa acceptabla gränsvärden (med övre och lägre gräns) för de negativa OD-kontrollvärdena. I tabell 2 anges de acceptabla gränsvärdena för de negativa OD-kontrollvärdena som gäller för de fyra validerade RhE-testmodeller som ingår i denna testmetod. Vid användning av en HPLC/UPLC-spektrofotometer ska de negativa OD-kontrollvärden som anges i tabell 2 användas som acceptanskriterier för den negativa kontrollen. Det bör finnas dokumenterat att de vävnader som behandlas med den negativa kontrollen är stabila i odlingar (ger motsvarande resultat vid viabilitetsmätning) under testets hela exponeringsperiod.

Tabell 2: Godkända OD-värden för den negativa kontrollen av satsens kvalitet

	Nedre gräns för cellhälsa	Övre gräns för cellhälsa
EpiSkin™ (SM)	$> 0,6$	$< 1,5$
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	$> 0,8$	$< 2,8$
SkinEthic™ RHE	$> 0,8$	$< 3,0$
epiCS®	$> 0,8$	$< 2,8$

Barriärfunktion

18. Hornlagret och dess lipidsammansättning ska räcka till för att stå emot snabb penetrering av cytotoxiska markörkemikalier (t.ex. SDS eller Triton X-100, enligt uppskattningar genom IC_{50} eller ET_{50} (tabell 3). I samband med leverans av vävnaderna till slutanvändaren bör RhE-modellens utvecklare/återförsäljare demonstrera barriärfunktionen för varje sats av modellen (se punkt 21).

Morfologi

19. Före påvisande av människoliknande hud i flera lager som innehåller basallager, taggcellslager, granulärt lager och hornlager och som uppvisar en lipidprofil som påminner om den mänskliga hudens lipidprofil bör en histologisk undersökning av RhE-modellen genomföras. I samband med leverans av vävnaderna till slutanvändaren bör RhE-modellens utvecklare/återförsäljare utföra en histologisk undersökning av varje sats av modellen (se punkt 21).

Reproducerbarhet

20. Metodanvändarna ska kunna säkerställa och påvisa testmetodens reproducerbarhet över tid, genom positiva och negativa kontroller. Testmetoden bör endast användas om utvecklaren/återförsäljaren av RhE-modellen kan tillhandahålla data som visar att modellen kan reproduceras över tid med korrosiva och icke-korrosiva kemikalier från listan över

kvalifikationsämnen (tabell 1). Vid användning av en testmetod för underkategorisering bör även reproducerbarheten gällande underkategoriseringen säkerställas och påvisas.

Kvalitetskontroll

21. Utvecklaren/leverantören av RhE-modellen bör säkerställa och påvisa att varje sats av den RhE-modell som används uppfyller de fastställda produktkriterierna, där kriterierna för *viabilitet* (punkt 17), *barriärfunktion* (punkt 18) och *morfologi* (punkt 19) är de viktigaste. Dessa data ges till metodanvändarna så att de kan införliva informationen i testrapporten. Endast resultat som har producerats med vävnader som klarat kvalitetskontrollen kan ge en tillförlitlig prediktion av korrosionsklassificering. RhE-modellens utvecklare/återförsäljare ska fastställa acceptabla gränsvärden (med övre och lägre gräns) för IC₅₀ eller ET₅₀. I tabell 3 anges de acceptabla gränsvärdena för de fyra validerade testmodellerna.

Tabell 3: Kvalitetskriterier för godkännande

	Nedre gräns för	Övre gräns för
EpiSkin™ (SM) (18 timmars behandling med SDS) (33)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (34)	ET ₅₀ = 4,0 timmar	ET ₅₀ = 8,7 timmar
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET ₅₀ = 4,0 timmar	ET ₅₀ = 10,0 timmar
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET ₅₀ = 2,0 timmar	ET ₅₀ = 7,0 timmar

Applicering av testkemikalien och kontrollämnen

22. Minst två vävnadsreplikater ska användas per testkemikalie och för kontrollerna i varje omgång. För vätskor och fasta ämnen appliceras en tillräcklig mängd av testkemikalien så att hudens yta täcks med ett jämnt lager så att en infinit dos undviks. Dosen ska vara minst 70 µl/cm² eller 30 mg/cm². För fasta ämnen fuktas hudens yta med avjoniserat eller destillerat vatten före appliceringen för att förbättra kontakten mellan testkemikalien och hudens yta (34) (35) (36) (37). När det är möjligt ska fasta ämnen testas i form av ett fint pulver. Appliceringsmetoden måste vara lämplig för testkemikalien (se hänvisningarna 34–37). Vid slutet av exponeringsperioden tvättas testkemikalien omsorgsfullt bort från hudens yta med buffrad vattenlösning eller 0,9-procentig NaCl. Beroende på vilken av de fyra validerade RhE-modellerna som används ska två eller tre exponeringsperioder användas per testkemikalie (för alla godkända RhE-modeller): 3 min och 1 timme, men för EpiSkin™ en ytterligare exponeringstid på 4 timmar. Inkubationstiden under exponeringen kan variera mellan rumstemperatur och 37 °C beroende på typ av RhE-testmodell och exponeringsperiod.

23. Negativa kontroller (NC) och positiva kontroller (PC) ska användas parallellt vid varje testomgång för att visa att viabiliteten (med NC), barriärfunktionen och den resulterande känsligheten (med PC) hos vävnaderna ligger inom fastställda godkända historiska värden. Föreslagna ämnen för positiv kontroll är isättika eller 8N KOH, beroende på vilken RhE-modell som används. Det bör noteras att 8N KOH reducerar MTT direkt och eventuellt kräver anpassade kontroller som de som beskrivs i punkterna 25 och 26. Föreslagna ämnen för negativ kontroll är 0,9-procentig NaCl eller vatten.

Mätning av cellernas viabilitet

24. MTT-metoden är en validerad kvantitativ metod som ska användas i denna testmetod för att mäta cellviabiliteten (27). Vävnadsprovet placeras i en MTT-lösning av lämplig koncentration (0,3 eller 1 mg/ml) i 3 timmar. Fällningen i form av blått formazan extraheras sedan från vävnaden med ett lösningsmedel (t.ex. isopropanol, sur isopropanol), och koncentrationen av formazan mäts genom bestämning av OD vid 570 nm med ett filterbandpass på högst ± 30 nm, eller med hjälp av en HPLC/UPLC-spektrofotometer (se punkterna 30 och 31) (38).
25. Testkemikalierna kan störa MTT-testet, antingen genom direkt reduktion av MTT till blått formazan och/eller genom färginterferens om testkemikalien absorberar ljus, i sitt ursprungliga tillstånd eller till följd av behandlingar, i samma OD-intervall som formazan (570 ± 30 nm, främst blå och lila kemikalier). I syfte att upptäcka och korrigera potentiell interferens från dessa testkemikalier bör ytterligare kontroller, som en icke-specifik MTT-reduktionskontroll (NSMTT) och en icke-specifik färgkontroll (NSC) användas (se punkterna 26–30). Detta är särskilt viktigt när en specifik testkemikalie inte kan tvättas bort helt och hållet från vävnaden eller när den har penetrerat huden och därför påvisas i vävnaden vid genomförande av MTT-viabilitetstestet. En detaljerad beskrivning av hur direkt MTT-reduktion och färgämnesinterferens kan korrigeras finns i SOP för de tre validerade testmodellerna (34) (35) (36) (37).
26. För att identifiera vilka av testkemikalierna som reducerar MTT bör de tillsättas en och en till ett nypreparerat MTT-medium (34) (35) (36) (37). Om MTT-blandningen som innehåller testkemikalien färgas blå/lila kan testkemikalien antas reducera MTT direkt, och då bör en ytterligare funktionskontroll utföras på icke-viabel epidermis, oberoende av om en standardmätningssmetod för absorbering (OD) eller en HPLC/UPLC-spektrofotometerprocedur har använts. I nämnda funktionskontroll ska död vävnad användas som endast har residual metabolisk aktivitet men som kan absorbera testkemikalien i samma mängd som viabel vävnad kan. Varje testkemikalie som kan reducera MTT ska appliceras på minst två döda vävnadsreplikater per exponeringstid, och dessa ska genomgå hela hudkorrosionstestet. Därefter beräknas vävnadens faktiska viabilitet utifrån procentandelen viabel vävnad som har exponerats för en MTT-reducerare minus procentandelen icke-specifik MTT-reduktion som erhålls från den döda vävnad som har exponerats för samma MTT-reducerare, och detta beräknas genom en jämförelse med den negativa kontroll som gjorts parallellt för det test som korrigeras (%NSMTT).

27. För att identifiera potentiell interferens av färgade testkemikalier eller av testkemikalier som färgas vid kontakt med vatten eller isopropanol och för att kunna avgöra om ytterligare kontroller behövs bör en spektral analys av testkemikalien utföras i vatten (miljö under exponering) och/eller i isopropanol (extraherande lösningsmedel). Om testkemikalien i vatten och/eller isopropanol absorberar ljus inom ett intervall på 570 ± 30 nm bör ytterligare färgningskontroller utföras, och om sådana kontroller inte behövs bör en HPLC/UPLC-spektrofotometerprocedur användas (se punkterna 30 och 31). Vid standardmätning av absorberingsgraden (OD) ska varje färgad interfererande testkemikalie appliceras på minst två viabla vävnadsreplikater per exponering, och dessa ska genomgå hela hudkorrosionstestet men ska inkuberas med ett medium i stället för en MTT-lösning under MTT-inkuberingsfasen för att generera en icke-specifik färgkontroll (NSC_{living}). NSC_{living} måste utföras samtidigt för varje färgad testkemikalie per exponering (i varje omgång) på grund av den levande vävnadens inneboende biologiska mångfald. Därefter beräknas vävnadens faktiska viabilitet efter procentandelen levande vävnad som erhålls efter det att den levande vävnaden har exponerats för en interfererande testkemikalie och inkuberats med en MTT-lösning minus procentandelen icke-specifik färg som erhålls från levande vävnad som har exponerats för den interfererande testkemikalien och inkuberats i ett medium utan MTT, parallellt med det test som korrigeras (%NSC_{living}).
28. Testkemikalier som bedöms producera både direkt MTT-reduktion (se punkt 26) och färginterferens (se punkt 27) kräver en tredje typ av kontroller utöver de NSMTT- och NSC_{living}-kontroller som beskrivs ovan vid genomförande av standardmätningar av absorberingsgrad (OD). Detta är vanligtvis fallet med mörkt färgade testkemikalier som interfererar med MTT-testet (t.ex. blå, lila, svart) eftersom deras naturliga färg gör det omöjligt att bedöma om de reducerar MTT direkt så som beskrivs i punkt 26. Dessa testkemikalier kan bindas till både levande och död vävnad, och en NSMTT-kontroll kan då utöver att korrigera den potentiella direkta MTT-reduktionen även korrigera den färginterferens som uppstår när testkemikalien binds till död vävnad. Detta kan leda till en dubbel korrigering av färginterferens eftersom NSC_{living} redan korrigerar färginterferens som uppstår när testkemikalien binds till levande vävnad. För att undvika dubbel korrigering av färginterferens krävs en tredje kontroll anpassad för icke-specifik färg i död vävnad (NSC_{killed}). Vid nämnda kontroll appliceras testkemikalien på minst två döda vävnadsreplikater vilka sedan genomgår hela testproceduren men inkuberas i ett medium i stället för i en MTT-lösning under MTT-inkubationsfasen. Det räcker med en enda NSC_{killed}-kontroll per testkemikalie oavsett antalet oberoende test/omgångar som har utförts, men kontrollen bör genomföras parallellt med NSMTT-kontrollen och, om det är möjligt, med samma sats av vävnadsprover. Därefter beräknas vävnadens faktiska viabilitet efter procentandelen levande vävnad som erhålls efter det att den levande vävnaden har exponerats för en interfererande testkemikalie och inkuberats med en MTT-lösning minus %NSMTT minus %NSC_{living} plus procentandelen icke-specifik färg som erhålls från levande vävnad som har exponerats för den interfererande testkemikalien och inkuberats i ett medium utan MTT, beräknat efter den negativa kontroll som utförts parallellt med det test som korrigeras (%NSC_{killed}).

29. Observera att icke-specifik MTT-reduktion och icke-specifik färginterferens kan öka avläsningen av vävnadsprovet så att det överskrider spektrofotometerns linjeintervall. Laboratoriet ska därför fastställa spektrofotometerns linjära område med MTT-formazan (CAS-nr 57360-69-7) från en kommersiell källa innan försök med testkemikalier för lagstadgade ändamål inleds. En standardmätning av absorberingsgrad (OD) med hjälp av en spektrofotometer är särskilt lämplig för bedömning av vilka kemikalier som direkt reducerar eller orsakar färginterferens i de fall testkemikalien, utan att ha korrigerats för direkt MTT-reduktion och/eller färginterferens, ger OD-värden som ligger inom spektrofotometerns linjeintervall eller i de fall den viabilitet som erhålls efter exponering av testkemikalien kan räknas som korrosiv redan innan den har korrigerats (se punkterna 35 och 36). Dock ska resultat utifrån negativa kontroller där testkemikalierna har producerat %NSMTT och/eller %NSC_{living} som är högre än 50 % beaktas med försiktighet.
30. För färgade testkemikalier som inte är kompatibla med standardmätningen för absorberingsgrad (OD) på grund av alltför stark interferens vid MTT-testet kan en alternativ HPLC/UPLC-spektrofotometerprocedur användas (se punkt 31) (37). HPLC/UPLC-spektrofotometersystemet gör det möjligt att separera MTT-formazanet från testkemikalien före kvantifiering (38). Därför behövs aldrig NSC_{living}- eller NSC_{killed}-kontroller vid användning av HPLC/UPLC-spektrofotometertechnik oavsett vilken kemikalie som testas. NSMTT-kontroller ska dock användas när det finns misstankar om att testkemikalien reducerar MTT direkt eller när den har en färg som gör det omöjligt att bedöma huruvida den kan reducera MTT direkt (enligt beskrivningen i punkt 26). Vid användning av en HPLC/UPLC-spektrofotometer för att mäta MTT-formazan beräknas vävnadens viabilitet som procentandelen topparea för MTT-formazan som erhållits med levande vävnad exponerad för testkemikalien, jämfört med procentandelen MTT-formazan-topparea som erhållits med parallellt utförda negativa kontroller. För testkemikalier som kan reducera MTT direkt beräknas vävnadens viabilitet genom den levande vävnadens viabilitet i procent minus %NSMTT. Slutligen bör nämnas att kemikalier som direkt reducerar MTT även kan orsaka färginterferens, vilken stannar kvar i vävnaden efter behandling och reducerar MTT så starkt att de orsakar OD-värden (påvisbart genom OD-standardmätning) eller toppareor (påvisbart genom användning av en UPLC/HPLC-spektrofotometer) på de testade vävnadsextrakt som faller utom spektrofotometerns linjeintervall och därför inte kan bedömas. Detta är dock väldigt ovanligt.
31. HPLC/UPLC-spektrofotometersystem kan användas för att mäta MTT-formazan för alla typer av testkemikalier (färgade, icke-färgade, de som reducerar MTT och de som inte gör det) (38). På grund av mångfalden av HPLC/UPLC-spektrofotometersystem ska HPLC/UPLC-spektrofotometersystemets godtagbarhet demonstreras innan det används för att kvantifiera MTT-formazan från vävnadsextrakt, genom att systemet uppfyller acceptanskriterierna för en uppsättning standardkvalifikationsparametrar som baseras på dem som har beskrivits i USA. Livsmedelsverkets riktlinjer för bioanalytisk metodvalidering inom industrin (38) (39). Dessa nyckelparametrar och deras acceptanskriterier anges i tillägg 4. När de acceptanskriterier som anges i tillägg 4 är uppfyllda ska HPLC/UPLC-spektrofotometersystemet anses vara godkänt och färdigt att användas för mätning av MTT-formazan under de testbetingelser som beskrivs i denna testmetod.

Acceptanskriterier

32. För varje testmetod där godkända RhE-modeller används ska vävnader som behandlats med negativ kontroll uppvisa OD-värden som återspeglar vävnadernas kvalitet enligt beskrivningen i tabell 2, och dessa bör inte ligga under de historiskt fastställda gränsvärdena. Vävnader som har behandlats med PC, dvs. isättika eller 8N KOH, ska återspegla vävnadernas responsförmåga på en frätande kemikalie under de förhållanden som gäller för testmodellen ifråga (se tillägg 2). Variabiliteten mellan de vävnadsreplikater som behandlats med testkemikalien och/eller kontrollkemikalier måste ligga inom de acceptabla gränsvärdena för varje godkänd RhE-modell (se tillägg 2) (t.ex. skillnaden i viabilitet mellan de två vävnadsreplikaten får inte överskrida 30 %). Om den negativa kontrollen eller en PC som ingår i en omgång ger resultat som faller utom de acceptabla gränsvärdena ska omgången anses vara icke-godkänd och måste göras om. Om en testkemikalie uppvisar en variabilitet som faller utanför de definierade gränsvärdena ska den testas på nytt.

Tolkning av resultaten och prediktionsmodell

33. De OD-värden som erhålls för varje testkemikalie används för att beräkna procentuell viabilitet i förhållande till den negativa kontrollen, som sätts till 100 %. Vid användning av en HPLC/UPLC-spektrofotometer beräknas vävnadens viabilitet som procentandelen topparea för MTT-formazan som erhållits med levande vävnad exponerad för testkemikalien, jämfört med procentandelen MTT-formazan-topparea som erhållits med parallellt utförda negativa kontroller. De avreglerade procentvärdena för cellviabilitet som skiljer korrosiva testkemikalier från icke-korrosiva (eller som skiljer olika korrosiva underkategorier från varandra) definieras nedan i punkterna 35 och 36, separat för varje testmodell som ingår i denna testmetod, och ska användas vid tolkning av resultaten.
34. En enda testomgång med minst tre vävnadsreplikater bör vara tillräcklig för en testkemikalie förutsatt att den resulterande klassificeringen är otvetydig. I fall av gränsresultat, såsom icke-konkordanta replikatomgångar, bör man överväga en andra testomgång, och även en tredje omgång om resultaten mellan de två första omgångarna är diskordanta.
35. Prediktionsmodellen för EpiSkin™-testmodellen för hudkorrosion (9) (34) (22), utifrån klassificeringssystemet för GHS/CLP, anges i tabell 4:

Tabell 4: EpiSkin™ prediktionsmodell

Viabilitet mätt i exponeringstidspoäng (t = 3, 60 och 240 minuter)	Prediktion att beakta
< 35 % efter 3 minuters exponering	Korrosivt: • Valfri underkategori 1A*
≥ 35 % efter 3 minuters exponering OCH < 35 % efter 60 minuters exponering ELLER ≥ 35 % efter 60 minuters exponering OCH < 35 % efter 240 minuters exponering	Korrosivt: • Kombination av valfria underkategorier 1B och 1C

≥ 35 % efter 240 minuters exponering	Icke-korrosivt

*) Vid bedömningen av RhE-testmodellernas användbarhet som stöd för underkategorisering påvisades att runt 22 % av underkategori 1A:s resultat för testmodellen EpiSkin™ faktiskt kan utgöras av ämnen eller blandningar som ingår i underkategori 1B eller 1C (dvs. går utöver klassificeringen) (se tillägg 3).

36. Prediktionsmodellerna för hudkorrosionstestmodellerna EpiDerm™ SCT (10) (23) (35), SkinEthic™ RHE (17) (18) (23) (36), och epiCS® (16) (23) (37), utifrån klassificeringssystemet för GHS/CLP, anges i tabell 5:

Tabell 5: EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE och epiCS®

Viabilitet mätt i exponeringstidspoäng (t = 3 och 60	Prediktion att beakta
STEG 1 för EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE och epiCS®	
< 50 % efter 3 minuters exponering	Korrosivt
≥ 50 % efter 3 minuters exponering OCH ≥ 15 % efter 60 minuters exponering	Korrosivt
≥ 50 % efter 3 minuters exponering OCH ≥ 15 % efter 60 minuters exponering	Icke-korrosivt
STEG 2 för EpiDerm™ SCT – för ämnen/blandningar som har identifierats som korrosiva i steg 1	
< 25 % efter 3 minuters exponering	Valfri underkategori 1A *
≥ 25 % efter 3 minuters exponering	Kombination av valfria underkategorier 1B och 1C
STEG 2 för SkinEthic™ RHE för ämnen/blandningar som har identifierats som korrosiva i steg 1	
< 18 % efter 3 minuters exponering	Valfri underkategori 1A *
≥ 18 % efter 3 minuters exponering	Kombination av valfria underkategorier 1B och 1C
STEG 2 för epiCS® – för ämnen/blandningar som har identifierats som korrosiva i steg 1	
< 15 % efter 3 minuters exponering	Valfri underkategori 1A *
≥ 15 % efter 3 minuters exponering	Kombination av valfria underkategorier 1B och 1C

DATA OCH RAPPORTERING

Data

37. För varje omgång ska data från enskilda vävnadsreplikater (t.ex. OD-värden och data om beräknad procentuell cellviabilitet för varje testkemikalie, inklusive klassificering) rapporteras i tabellform, i tillämpliga fall även data från upprepade försök. Utöver detta ska medelvärden, viabilitetsintervall och variationskoefficienterna mellan vävnadsreplikaten redovisas för varje

test. Observerade interaktioner med MTT-reagenset av ämnen som direkt reducerar MTT eller av färgade testkemikalier ska rapporteras för varje testad kemikalie.

Testrapport

38. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie och kontrollkemikalier:

- Monokomponentämne: kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.
- Multikomponentämne, UVCB och blandningar: Karakteriseras så långt som möjligt genom kemisk beteckning (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.
- Fysikaliskt tillstånd, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.
- Ursprung, satsnummer om sådant finns.
- Eventuell behandling av testkemikalien/kontrollämnet före testning (t.ex. uppvärmning, malning).
- Testkemikalies stabilitet, sista förbrukningsdatum eller sista datum för upprepad analys, om känt.
- Lagringsförhållanden.

Vilken RhE-modell och vilket protokoll som har använts med motivering (i förekommande fall)

Testbetingelser:

- RhE-modell (inklusive satsnummer).
- Kalibreringsinformation för mätningssinstrument (t.ex. spektrofotometer), våglängd och filterbandpass (i förekommande fall) som har använts för kvantifiering av MTT-formazan, samt mätinstrumentets linjeintervall.
- Beskrivning av den metod som har använts för att kvantifiera MTT-formazan.
- Beskrivning av kvalitetsbestämningen av HPLC/UPLC-spektrofotometersystemet (i förekommande fall).
- Fullständig stödjande information för den specifika RhE-modell som använts, inklusive modellens prestanda. Dessa ska omfatta, men inte vara begränsade till, följande:
 - i) Viabilitet.
 - ii) Barriärfunktion.
 - iii) Morfologi.

iv) Reproducerbarhet och prediktionskapacitet.

v) Kvalitetskontroller av modellen.

- Hänvisning till historiska uppgifter om modellen. Dessa ska omfatta men inte vara begränsade till följande:
- Uppgifter om huruvida kvalitetskontrolluppgifterna är godtagbara med avseende på historiska uppgifter om respektive använd sats.
- Demonstrationen av kompetens för utförande av testmetoden ska göras före rutinanvändning, genom testning av kvalifikationsämnen.

Provningsförfarande:

- Detaljerad beskrivning av testet (inklusive tvättning efter exponering).
- Doserna för den testkemikalie och de kontrollkemikalier som använts.
- Exponeringstid och exponeringstemperatur(er).
- Uppgifter om kontroller som använts för direkt MTT-reduktion och/eller färgade testkemikalier, i förekommande fall.
- Antal vävnadsreplikat som använts per testkemikalie och kontroll (PC, negativa kontroller och NSMTT, NSC_{living} och NSC_{killed}, i förekommande fall), per exponeringstid.
- Beskrivning av beslutskriterierna/den prediktionsmodell som använts beroende på RhE-modell.
- Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet (inklusive tvättningsförfarandet).

Acceptanskriterier för testet och omgången:

- Medelvärden och godtagbara intervall för parallella positiva och negativa kontroller på grundval av historiska data.
- Acceptabel variabilitet mellan vävnadsreplikaten för negativa och positiva kontroller.
- Acceptabel variabilitet mellan vävnadsreplikaten som behandlats med testkemikalien.

Resultat:

- Redovisning i tabellform av individuella testkemikalier och kontroller, för varje exponeringsperiod, testomgång och replikatmätning inklusive OD-värden eller toppareor för MTT-formazan, vävnadsviabilitet i procent, vävnadens medelviabilitet i procent, skillnader mellan replikaten samt i förekommande fall standardavvikelser och/eller variationskoefficienter.
- I förekommande fall även resultaten från de kontroller som använts för ämnen som direkt reducerar och/eller för färgande testkemikalier, inklusive OD-värden eller toppareor för MTT-formazan, %NSMTT, %NSC_{living}, %NSC_{killed}, skillnader mellan vävnadsreplikat,

standardavvikelser och/eller variationskoefficienter (i förekommande fall) samt den slutliga korrekta vävnadsviabiliteten i procent.

- Resultaten för testkemikalier och kontrollkemikalier utifrån definierade acceptanskriterier för omgången och testet.
- Beskrivning av övriga observerade effekter.
- Härledda klassificeringar med hänvisning till förekommande prediktionsmodell/beslutskriterier.

Diskussion av resultaten

Slutsatser

LITTERATURHÄNVISNINGAR

- (1) FN (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva. Tillgänglig på:
http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (2) Kapitel B.4 i denna bilaga, Akut hudirritation/hudkorrosion.
- (3) Kapitel B.40 i denna bilaga, Hudkorrosion in vitro.
- (4) Kapitel B.65 i denna bilaga, In vitro-membranbarriärtest för hudkorrosion.
- (5) Kapitel B.46 i denna bilaga, Hudirritation in vitro: Testmetod med rekonstruerad human epidermis.
- (6) OECD (2014). Vägledningsdokument om ett integrerat synsätt på testning och bedömning av hudirritation/hudkorrosion (IATA). Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 203, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (7) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Poncet, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. och Balls, M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 *ATLA* 23:219–255.
- (8) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., och Worth, A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol. in vitro* 12, s. 471–482.
- (9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsall, D.J., Holzhutter, H.G. och Liebsch, M (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Resultat och ledningsgruppens bedömning. *Toxicol. in vitro* 12, s. 483–524.
- (10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. och Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: s. 371–401.
- (11) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., och Zucco, F. (1995). Praktiska aspekter på validering av testmetoder för toxicitet. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, *ATLA* 23, s. 129–147.

- (12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication nr 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM:s bedömning av EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM) och TER-testet för transkutan elektrisk motstånd i rått hud: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication nr 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA
- (14) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), utfärdad av ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), den 3 april 1998.
- (15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, utfärdad av ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 mars 2000.
- (16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. och Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol. in vitro* 19: s. 925–929.
- (17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann, H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N., Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., och Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol. in vitro* 20 s. 547–559.
- (18) Tornier C., Roquet M. och Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0.5 cm² Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: s. 1379–1385.
- (19) EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, utfärdad av ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), den 17 november 2006.
- (20) EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, utfärdad av ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), den 12 juni 2009.
- (21) OECD (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. OECD Environment, Health

and Safety publications, Series on Testing and Assessment nr.190. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

- (22) Alépée N., Grandidier M.H., och Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision av OECD:s vägledningsdokument 431. *Toxicol. In Vitro* 28:131-145.
- (23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., och Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055-2080.
- (24) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling. Paris
- (25) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. . Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 34, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (26) Eskes C. m.fl. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62:393–403.
- (27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Metoder* 65, s. 55–63.
- (28) Tinois E., m.fl. (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro*. I: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier A., Goldberg A.M och Maibach H.I. (Eds): s. 133–140.
- (29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. och Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol. in vitro* 8, s. 889–891.
- (30) Ponec M., Boelsma E., Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J och Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. *Inter. J. Pharmaceu.* 203, s. 211–225.
- (31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. och Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post-Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193, s. 310–319.

- (32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS och Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9, s. 163–171.
- (33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF och Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8, s. 747–756.
- (34) EpiSkin™ SOP (december 2011). *INVITTOX* protokoll nr 118. EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.
- (35) EpiDerm™ SOP (februari 2012). Version MK-24-007-0024 protokoll för: *In Vitro* EpiDerm™-testet för hudkorrosion (EPI-200-SCT), för användning med MatTek Corporations modell för rekonstruerad human epidermis EpiDerm.
- (36) SkinEthic™ RHE SOP (januari 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.
- (37) EpiCS® SOP (januari 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.
- (38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., och McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: s. 741–761.
- (39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (maj 2001). Tillgänglig på:
[\[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf\]](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf).

Tillägg 1

DEFINITIONER

Noggrannhet: Ett mått på hur testmetodens resultat överensstämmer med de godtagna referensvärdena. Exakthet är ett mått på testmetodens prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (25).

Cellviabilitet: en parameter för att mäta den totala aktiviteten hos en cellpopulation, t.ex. förmågan hos cellernas mitokondriella dehydrogenaser att reducera vitalfärgämnet MTT (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid, tiazolylblått). Denna aktivitet korrelerar, beroende på vilken endpoint som mäts och vilken testutformning som används, med det totala antalet levande celler och/eller dessa cellers vitalitet.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Konkordans: ett mått på testmetodens prestanda för sådana testmetoder som ger kategoriska resultat, och en aspekt av relevans. Termen används ibland omväxlande med exakthet och definieras som andelen av alla testade kemikalier som klassificeras korrekt som positiva eller negativa. Konkordansen är direkt beroende av förekomsten av positiva värden i den testkemikalie som undersöks (25).

ET₅₀: uppskattas genom bestämning av den exponeringstid som krävs för att minska cellviabiliteten med 50 % vid applicering av markörkemikalien vid en specificerad, fast koncentration; se även IC₅₀.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals): ett system för att klassificera kemikalier (ämnena och blandningar) enligt standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker, och informera om resultaten genom t.ex. piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad i syfte att informera om kemikaliernas skadliga effekter för att skydda personer (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) samt miljön (1).

HPLC: högupplösande vätskekromatografi.

IATA: integrerat synsätt på testning och bedömning.

IC₅₀: kan uppskattas genom bestämning av den koncentration vid vilken en markörkemikalie minskar vävnadernas viabilitet med 50 % (IC₅₀) efter en fast exponeringstid; se även ET₅₀.

Infini dos: den mängd testkemikalie som applicerats på huden och som överstiger den mängd som krävs för att helt täcka hudens yta med ett jämnt lager. **Blandning:** en blandning eller en lösning som består av två eller flera ämnen i vilka de inte reagerar.

Monokomponentämne: ett ämne, definierat av sin kvantitativa sammansättning, där en huvudsaklig beståndsdel utgör minst 80 viktprocent.

MTT: 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid, tiazolylblått-tetrazoliumbromid.

Multikomponentämne: ett ämne, definierat av sin kvantitativa sammansättning, där mer än en huvudsaklig beståndsdel förekommer i en koncentration på > 10 och < 80 viktprocent. Ett multikomponentämne är resultatet av en tillverkningsprocess. Skillnaden mellan blandningar och multikomponentämnena är att en blandning erhålls genom att två eller flera ämnen blandas utan kemisk reaktion. Ett multikomponentämne är resultatet av en kemisk reaktion.

NC: icke-korrosiv.

NSC_{killed}-kontroll: kontroll för icke-specifik färg i döda vävnader.

NSC_{living}-kontroll: kontroll för icke-specifik färg i levande vävnader.

NSMTT: icke-specifik MTT-reduktion.

OD: optisk densitet.

PC: positiv kontroll, dvs. ett replikat som innehåller ett testsystems alla komponenter och som behandlas med en kemikalie som man vet ger positiv respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsens variationer kan bedömas över tid, bör den kraftiga irritation som framkallas inte vara överdriven.

Prestandastandarder (PS): standarder som baseras på en validerad testmetod och som utgör grunden för utvärdering av jämförbarheten för en föreslagen testmetod som är mekaniskt och funktionellt likartad. Följande ingår: i) Testmetodens grundläggande komponenter, ii) en minimiförteckning med referenskemikalier som valts ut från de kemikalier som använts för att påvisa att den validerade metoden fungerar tillfredsställande, och iii) de jämförbara nivåer av exakthet och tillförlitlighet, på grundval av vad som erhållits för den validerade testmetoden, som man bör kunna påvisa för den föreslagna testmetoden när den utvärderas med användning av minimiförteckningen med referenskemikalier (25).

Relevans: beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida detta förhållande är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl man genom testet korrekt kan mäta och förutse den biologiska effekt det gäller. Relevans omfattar också överväganden om en testmetods noggrannhet (konkordans) (25).

Tillförlitlighet: mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tid när den utförs med hjälp av samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier (25).

Testomgång: en eller flera testkemikalier som testas parallellt med en negativ kontroll och med en PC.

Sensitivitet: den andel av alla positiva/aktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testet. Sensitiviteten är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (25).

Hudkorrosion in vivo en irreversibel skada på huden i form av synlig nekros genom epidermis och in i dermis, efter applicering av en testkemikalie i upp till fyra timmar. Typiska korrosiva reaktioner är sår, blodiga sårskorpor och, vid slutet av observationsperioden på 14 dagar, avfärgning genom blekning av huden, hela områden med alopeci (håravfall) och ärr. Histopatologi bör övervägas för att bedöma tveksamma skador.

Specificitet: den andel av alla negativa/inaktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testet. Specificiteten är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (25).

Ämne: kemiskt grundämne och föreningar av detta grundämne i naturlig eller tillverkad form, inklusive de eventuella tillsatser som är nödvändiga för att bevara dess stabilitet och sådana föroreningar som härrör från tillverkningsprocessen, men exklusive eventuella lösningsmedel som kan avskiljas utan att det påverkar ämnets stabilitet eller ändrar dess sammansättning.
Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

UPLC: Ultrahögupplösande vätskekromatografi.

UVCB-ämne: ämne med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter och biologiskt material.

Tillägg 2

HUVUDKOMPONENTERNA I DE RHE-TESTMODELLER SOM VALIDERATS FÖR TESTNING AV HUDKORROSION

Testmodellern as komponenter	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Modellyta	0,38 cm ²	0,63 cm ²	0,5 cm ²	0,6 cm ²
Antal vävnadsreplika t	Minst 2 per exponering	2–3 per exponering	Minst 2 per exponering	Minst 2 per exponering

Testmodellern as komponenter	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Behandlingsdos er och applicering	<u>Vätskor och trögflytande ämnen:</u> 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm²) <u>Fasta ämnen:</u> 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm²) + 100 µl ± 5µl NaCl solution (9 g/l) <u>Vaxaktiga/klibbiga ämnen:</u> 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm²) med nylonnät	<u>Vätskor:</u> 50 µl (79,4 µl/cm²) med eller utan nylonnät <i>Förtest för att se om testkemikalien är kompatibel med nylonnätet</i> <u>Halvfasta ämnen:</u> 50 µl (79,4 µl/cm²) <u>Fasta ämnen:</u> 25 µl H₂O (eller mer om det krävs) + 25 mg (39,7 mg/cm²) <u>Vaxer:</u> Platt ”skivformad” bit på ca 8 mm i diameter som placeras ovanpå vävnaden och väts med 15 µl H₂O.	<u>Vätskor och trögflytande ämnen:</u> 40 µl ± 3µl (80 µl/cm²) med nylonnät <i>Förtest för att se om testkemikalien är kompatibel med nylonnätet</i> <u>Fasta ämnen:</u> 20 µl ± 2µl H₂O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) <u>Vaxaktiga/klibbiga ämnen:</u> 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) med nylonnät	<u>Vätskor:</u> 50 µl ± cm2 (83,3 µl/cm²) med nylonnät <i>Förtest för att se om testkemikalien är kompatibel med nylonnätet</i> <u>Halvfasta ämnen:</u> 50 µl (83,3 µl/cm²) <u>Fasta ämnen:</u> 25 mg (41,7 mg/cm²) + 25 µl H₂O (eller mer om det krävs) <u>Vaxaktiga ämnen:</u> Platt ”kaka” bit på ca 8 mm i diameter som placeras ovanpå vävnaden och väts med 15 µl H₂O.
Förberedande test av direkt MTT-reduktion	50 µl (vätskor) eller 20 mg (fasta ämnen) + 2 ml MTT 0,3 mg/ml lösning för 180 ± 5 min vid 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH → om lösningen färgas blå/lila ska anpassade water killed-kontroller genomföras	50 µl (vätskor) eller 25 mg (fasta ämnen) + 1 ml MTT 1 mg/ml lösning för 60 min vid 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH → om lösningen färgas blå/lila ska anpassade freeze killed-kontroller genomföras	40 µl (vätskor) eller 20 mg (fasta ämnen) + 1 ml MTT 1 mg/ml solution för 180 ± 15 min vid 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH → om lösningen färgas blå/lila ska anpassade freeze killed-kontroller genomföras	50 µl (vätskor) eller 25 mg (fasta ämnen) + 1 ml MTT 1 mg/ml lösning för 60 min vid 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH → om lösningen färgas blå/lila ska anpassade freeze killed-kontroller genomföras

Testmodellern as komponenter	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Förberedande test för färginterferens	10 µl (vätskor) eller 10 mg (fasta ämnen) + 90 µl H ₂ O som blandas i 15 min vid rumstemperatur →om lösningen färgas ska anpassade kontroller genomföras	50 µl (vätskor) eller 25 mg (fasta ämnen) + 300 µl H ₂ O i 60 min vid 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH →om lösningen färgas ska anpassade living-kontroller genomföras	40 µl (vätskor) eller 20mg (fasta ämnen) + 300 µl H ₂ O som blandas i 60 min vid rumstemperatur → om testkemikalien färgas ska anpassade living-kontroller genomföras	50 µl (vätskor) eller 25 mg (fasta ämnen) + 300 µl H ₂ O i 60 min vid 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH →om lösningen färgas ska anpassade living-kontroller genomföras
Exponering Tid och temperatur	3 min, 60 min (± 5 min) och 240 min (± 10 min) I ventilerad kammare rumstemperatur (RT, 18-28 °C)	3 min i rumstemperatur, och 60 min vid 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH	3 min i rumstemperatur, och 60 min vid 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH	3 min i rumstemperatur, och 60 min vid 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH
Sköljning	25 ml 1 × PBS (2 ml/gång)	20 gånger med en mjuk och konstant stråle av 1 × PBS	20 gånger med en mjuk och konstant stråle av 1 × PBS	20 gånger med en mjuk och konstant stråle av 1 × PBS
Negativ kontroll	50 µl saltlösning (9 g/l) Testad för varje exponeringstid	50 µl H ₂ O Testad för varje exponeringstid	40 µl H ₂ O Testad för varje exponeringstid	50 µl H ₂ O Testad för varje exponeringstid
Positiv kontroll	50 µl isättika Testad i endast 4 timmar	50 µl 8N KOH Testad för varje exponeringstid	40 µl 8N KOH Testad i endast 1 timme	50 µl 8N KOH Testad för varje exponeringstid
MTT-lösning	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml

Testmodellern as komponenter	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
MTT- inkubering Tid och temperatur	180 min (± 15 min) vid 37 °C, 5% CO ₂ , 95 % RH	180 min vid 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH	180 min (± 15 min) vid 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH	180 min vid 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH
Extraktionslösning	500 µl surgjord isopropanol (0,04 N HCl i isopropanol) (isolerad helt nedsänkt vävnad)	2 ml isopropanol (som extraheras från insertens topp och botten)	1,5 ml isopropanol (som extraheras från insertens topp och botten)	2 ml isopropanol (som extraheras från insertens topp och botten)
Extraktionstid och extraktionstemperatur	Över natten vid rumstemperatur, skyddad från ljus	Över natten utan att skakas, vid rumstemperatur eller i 120 min utan att skakas (~120 rpm) vid rumstemperatur	Över natten utan att skakas, vid rumstemperatur eller i 120 min utan att skakas (~120 rpm) vid rumstemperatur	Över natten utan att skakas, vid rumstemperatur eller i 120 min utan att skakas (~120 rpm) vid rumstemperatur
Avläst OD-värde	570 nm (545–595 nm) utan referensfilter	570 nm (eller 540 nm) utan referensfilter	570 nm (540–600 nm) utan referensfilter	540–570 nm utan referensfilter
Kvalitetskontroll av vävnad	18 timmars behandling med SDS 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,0 mg/ml	Behandling med 1 % Triton X-100 4,08 timmar ≤ ET ₅₀ ≤ 8,7 timmar	Behandling med 1 % Triton X-100 4,0 timmar ≤ ET ₅₀ ≤ 10,0 timmar	Behandling med 1 % Triton X-100 2,0 timmar ≤ ET ₅₀ ≤ 7,0 timmar

Testmodellern as komponenter	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Acceptanskriterier	1. Medelvärde för optisk densitet på de vävnadsreplikater som behandlats med den negativa kontrollen (NaCl) ska vara $\geq 0,6$ och $\leq 1,5$ för varje exponeringstid. 2. Viabilitetsmedelvärde för de vävnadsreplikater som exponerats under fyra timmar med den positiva kontrollen (isättika), uttryckt som % av den negativa kontrollen, ska vara ≤ 20 %. 3. Skillnaden i viabilitet mellan två vävnadsreplikater får inte överskrida 30 %, dvs. inom intervallet 20–100 % för viabilitet och $\geq 0,3$ när det gäller optisk densitet.	1. Medelvärde för optisk densitet på de vävnadsreplikater som behandlats med den negativa kontrollen (H₂O) ska vara $\geq 0,8$ och $\leq 2,8$ för varje exponeringstid. 2. Viabilitetsmedelvärde för de vävnadsreplikater som exponerats under en timme med den positiva kontrollen (8N KOH), uttryckt som % av den negativa kontrollen, ska vara ≤ 15 %. 3. Inom viabilitetsintervallet på 20–100 % ska variationskoefficienten (CV) mellan vävnadsreplikaten vara ≤ 30 %.	1. Medelvärde för optisk densitet på de vävnadsreplikater som behandlats med den negativa kontrollen (H₂O) ska vara $\geq 0,8$ och $\leq 3,0$ för varje exponeringstid. 2. Medelviabilitetsvärdet för de vävnadsreplikater som exponerats i en timme (och i fyra timmar, i förekommande fall) med den positiva kontrollen (8N KOH), uttryckt som % av den negativa kontrollen, ska vara < 15 %. 3. Vid ett viabilitetsintervall på 20–100 % och ett OD-värde på $\geq 0,3$ får skillnaden i viabilitet mellan de två vävnadsreplikaten inte överskrida 30 %.	1. Medelvärde för optisk densitet på de vävnadsreplikater som behandlats med den negativa kontrollen (H₂O) ska vara $\geq 0,8$ och $\leq 2,8$ för varje exponeringstid. 2. Viabilitetsmedelvärde för de vävnadsreplikater som exponerats under en timme med den positiva kontrollen (8N KOH), uttryckt som % av den negativa kontrollen, ska vara < 20 %. 3. Vid ett viabilitetsintervall på 20–100 % och ett OD-värde på $\geq 0,3$ får skillnaden i viabilitet mellan de två vävnadsreplikaten inte överskrida 30 %.

Tillägg 3

TESTMODELLERNAS PRESTANDA FÖR UNDERKATEGORISERING

Tabellen nedan visar prestandan för de beräknade testmodellerna baserat på en uppsättning av 80 kemikalier som testats av fyra testutvecklare. Beräkningarna genomfördes av OECD:s sekretariat och granskades och godkändes av en undergrupp av experter (21) (23).

Testmodellerna EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE och epiCS® kan användas för underkategorisering (dvs. mellan 1A och 1B respektive 1C och NC).

De fyra testmodellernas prestanda och grad av överklassificering respektive exakthet (prediktionskapacitet) baserat på en uppsättning av 80 kemikalier som alla testats i två eller tre omgångar i varje testmodell:

PREDIKTIONSSTATISTIK FÖR SAMTLIGA KEMIKALIER				
(n = 80 kemikalier som testats i två oberoende testomgångar för epiCS® eller i tre oberoende testomgångar för EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ och SkinEthic™ RHE, dvs. 159* respektive 240 klassificeringar)				
<i>* en kemikalie testades endast en gång i epiCS® på grund av bristande tillgång (23)</i>				
	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Överklassificeringar:				
1B-och-1C överklassificerade 1A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
NC överklassificerade 1B och 1C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
NC överklassificerade 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
överklassificerade korr.	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Global överklassificeringsgrad (samtliga	17,9 %	23,3 %	24,5 %	25,8 %
Underklassificeringar:				
1A underklassificerade 1B och 1C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A underklassificerade NC	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B och 1C underklassificerade NC	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Global underklassificeringsgrad (samtliga	3,3 %	2,5 %	5,4 %	4,4 %
Korrekta klassifikationer:				
1A korrekt klassificerad	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
1B och 1C korrekt klassificerade	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %

NC korrekt klassificerad	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Total exakthet	78,8 %	74,2 %	70 %	69,8 %

NC: Icke-korrosivt

Tillägg 4

Nyckelparametrar och acceptanskriterier för kvalificering av HPLC/UPLC-spektrofotometersystem för mätning av MTT-formazan som extraherats ur RhE-vävnad

Parametrar	Protokoll från FDA:s vägledning (37) (38)	Acceptanskriterier
Selektivitet	Analys av isopropanol, blanka levande kontroller (isopropanolextrakt från obehandlad levande RhE-vävnad), blanka döda kontroller (isopropanolextrakt från obehandlad död RhE-vävnad)	$\text{Area}_{\text{interferens}} \leq 20 \% \text{ av } \text{area}_{\text{LLOQ}}^1$
Precision	Kvalitetskontroller (dvs. MTT-formazan vid 1,6 µg/ml, 16 µg/ml och 160 µg/ml) i isopropanol (n = 5)	$\text{CV} \leq 15 \% \text{ eller } \leq 20 \% \text{ för LLOQ-området}$
Noggrannhet	Kvalitetskontroller i isopropanol (n = 5)	$\% \text{Dev} \leq 15 \% \text{ eller } \leq 20 \% \text{ för LLOQ}$
Matriseffekt	Kvalitetskontroller i blanka levande kontroller (n = 5)	$85 \% \leq \text{matriseffekt i } \% \leq 115 \%$
Återföring (carry over)	Analys av isopropanol efter ULOQ ² -standard	$\text{Område}_{\text{interferens}} \leq 20 \% \text{ av område}_{\text{LLOQ}}$
Reproducerbarhet (över dagen)	Tre oberoende kalibreringskurvor (baserade på sex på varandra följande spädningar av MTT-formazan i isopropanol (1:3) med start i ULOQ, dvs. 200 µg/ml) Kvalitetskontroller i isopropanol (n = 5)	Kalibreringskurvor: $\% \text{Dev} \leq 15 \% \text{ eller } \leq 20 \% \text{ för LLOQ}$ Kvalitetskontroller: $\% \text{Dev} \leq 15 \% \text{ och } \text{CV} \leq 15 \%$
Reproducerbarhet (från dag till dag)	Dag 1: En kalibreringskurva och kvalitetskontroller i isopropanol (n = 3) Dag 2: En kalibreringskurva och kvalitetskontroller i isopropanol (n = 3) Dag 3: En kalibreringskurva och kvalitetskontroller i isopropanol (n = 3)	
MTT-formazanets kortsiktiga stabilitet i RhE-vävnadsextrakt	Kvalitetskontroller i blanka levande kontroller (n = 3) som analyserats på dagen för beredningen samt efter 24 timmars förvaring i rumstemperatur	
MTT-formazanets långsiktiga stabilitet i RhE-vävnadsextrakt, i förekommande fall	Kvalitetskontroller i blanka levande kontroller (n = 3) som analyserats på dagen för beredningen samt efter flera dagars förvaring vid specifik temperatur (t.ex. 4 °C, -20 °C, -80 °C)	$\% \text{Dev} \leq 15 \%$

1LLOQ: Undre kvantifieringsgräns, definierad för att omfatta 1–2 % vävnadsviabilitet, dvs. 0,8 µg/ml.

2ULOQ: Övre kvantifieringsgräns, definierad för att vara minst dubbel så hög som den högsta förväntade koncentrationen av MTT-formazan i isopropanolextrakt från negativa kontroller, dvs. 200 µg/ml.”

7) I del B ska kapitel B.46 ersättas med följande:

”B.46 HUDIRRITATION IN VITRO: TESTMETOD MED REKONSTRUERAD HUMAN EPIDERMIS

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 439 (2015). Med hudirritation avses uppkomsten av en reversibel skada på huden efter applicering av en testkemikalie i upp till fyra timmar, enligt definitionen i Förenta nationernas globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (1) och Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP)¹. Denna testmetod beskriver ett in vitro-förfarande som kan användas för identifiering av faror med irriterande kemikalier (ämnen och blandningar) enligt GHS/CLP-kategori 2 (2). I regioner som inte har antagit den valfria GHS-kategorin 3 (svagt irriterande ämnen) kan denna testmetod även användas för att identifiera icke-klassificerade kemikalier. Beroende på gällande lagstiftning och det klassificeringssystem som används kan denna testmetod därför användas för att bestämma huruvida kemikalier är irriterande för huden, antingen som ett självständigt test som ersätter in vivo-testning för hudirritation eller som ett partiellt ersättningstest inom ramen för en teststrategi (3).
2. Bedömningen av hudirritation har i regel inneburit användning av försöksdjur (TM B.4, likvärdig med OECD TG 404 som antogs 1981 och reviderades 1992, 2002 och 2015) (4). Tre validerade in vitro-testmetoder har antagits för testning av korrosivitet: OECD TM B.40 (likvärdig med OECD TG 430), TM B.40a (likvärdig med OECD TG 431) och TM B.65 (likvärdig med OECD TG 435) (5) (6) (7). I OECD:s vägledningsdokument om ett integrerat synsätt på testning och bedömning (IATA) av hudkorrosion och hudirritation beskrivs flera moduler som grupperar olika informationskällor och analysverktyg, och där det ges i) vägledning om hur tillgängliga testdata och icke testdata kan integreras och användas i bedömningen av kemikaliers potential för hudirritation och hudkorrosion och ii) förslag på hur man ska gå till väga när det krävs ytterligare testning (3).
3. Denna testmetod gäller endpointen hudirritation hos människa. Den baseras på ett in vitro-testsystem av rekonstruerad human epidermis (RhE), som nära efterliknar de övre delarna av människans hud (dvs. epidermis) vad gäller biokemiska och fysiologiska egenskaper. RhE-testsystemet använder sig av icke-transformerade humana keratinocyter som cellkälla

¹ 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).

för att skapa en epidermismodell med representativ histologi och cytoarkitektur. Det finns prestandastandarder (PS) som underlättar validering och bedömning av liknande eller modifierade RhE-baserade testmetoder, i enlighet med OECD:s vägledningsdokument nr 34 (8) (9). Motsvarande testriktlinje antogs för första gången 2010 och uppdaterades 2013 för att inkludera ytterligare RhE-modeller, och 2015 för att ta med hänvisningar till vägledningsdokumentet om IATA och introducera användningen av en alternativ metod för mätning av viabilitet.

4. Förvalideringsstudier, optimeringsstudier och valideringsstudier har slutförts för fyra in vitro-testmodeller som är tillgängliga i handeln (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) och som är baserade på RhE-testsystemet (80 % sensitivitet, 70 % specificitet och 75 % exakthet). Dessa fyra testmodeller ingår i denna TG och listas i tillägg 2, där man också kan finna information om vilken typ av valideringsstudie som har använts för att validera respektive testmetod. Som anges i tillägg 2 har den validerade referensmetoden (VRM) använts för att utveckla denna testmetod och prestandastandarderna (8).
5. OECD:s ömsesidiga dataacceptans kan endast garanteras för testmodeller som validerats enligt prestandastandarderna (8) och granskats och antagits av OECD. De testmodeller som ingår i denna testmetod och motsvarande OECD-testriktlinjer kan båda användas för att möta olika länders krav på testresultat från in vitro-testmetoder för hudirritation, tack vare den ömsesidiga dataacceptansen.
6. Definitioner för termer som används i detta dokument ges i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

7. En begränsning hos testmetoden, såsom påvisas i den fullständiga prospektiva valideringsstudie som bedömt och karaktäriserat RhE-testmetoder (16), är att den inte möjliggör klassificering av kemikalier för den frivilliga GHS-kategorin 3 (svagt irriterande ämnen) (1). Därför kommer lagstiftningen i respektive medlemsland att avgöra hur denna testmetod ska användas. Kategori 3 har inte antagits i CLP inom EU. För en fullständig bedömning av lokala effekter på huden efter en enstaka dermal exponering, se OECD:s vägledningsdokument IATA (3). Användningen av human hud är föremål för nationella och internationella etiska överväganden och begränsningar.
8. Denna testmetod gäller endpointen hudirritation hos människa. Även om denna testmetod inte ger tillräcklig information om hudkorrosion bör noteras att TM B.40a (likvärdig med OECD TG 431) om hudkorrosion baseras på samma RhE-testsystem, om än med användning av ett annat protokoll (6). Denna testmetod baseras på RhE-modeller med humana keratinocyter, som därför representerar målorganet in vitro hos den art det gäller. Metoden täcker dessutom direkt det inledande steget hos den inflammatoriska kaskaden/verkningsmekanismen (cell- och vävnadsskada som leder till lokaliserat trauma) som inträffar vid irritation in vivo. Ett stort spektrum av kemikalier har testats vid den

validering som ligger till grund för denna testmetod, och valideringsstudiens databas omfattade totalt 58 kemikalier (16) (18) (23). Testmetoden kan tillämpas på fasta ämnen, vätskor, halvfasta ämnen och vaxer. Vätskorna kan vara vattenbaserade eller inte. Fasta ämnen kan vara vattenlösliga eller icke-vattenlösliga. Fasta ämnen ska alltid när det är möjligt malas ned till fint pulver före appliceringen, och ingen annan beredning behövs. Gaser och aerosoler har ännu inte bedömts genom valideringsstudier (29). Det är tänkbart att de kan testas med RhE-teknik, men den aktuella testmetoden ger inte möjlighet att testa gaser och aerosoler.

9. Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag. Med tanke på att blandningar omfattar en stor mängd kategorier och sammansättningar och det i nuläget endast finns begränsad information om testning av blandningar bör dock testmetoden inte användas på blandningskategorier för vilka den har visat sig vara icke-tillämplig (t.ex. i enlighet med den strategi som föreslås av Eskes m.fl. 2012 (30)). Liknande försiktighet bör iakttas när specifika kemiska klasser eller fysikalisk-kemiska egenskaper visar sig inte vara tillämpliga för denna testmetod.
10. Testkemikalier som absorberar lika mycket ljus som MTT-formazan och testkemikalier som direkt kan reducera vitalfärgämnet MTT (till MTT-formazan) kan påverka cellviabilitetsmätningen och kräver därför anpassade kontroller för att korrigeras (se punkterna 28–34).
11. En enda testomgång med tre vävnadsreplikater bör vara tillräckligt för en testkemikalie förutsatt att klassificeringen är otvetydig. I fall av gränsresultat, såsom icke-konkordanta replikatmätningar och/eller genomsnittlig procentuell viabilitet lika med 50 ± 5 %, bör man överväga en andra testomgång, och en tredje omgång om resultaten mellan de två första omgångarna är diskordanta.

TESTPRINCIP

12. Testkemikalien appliceras topikalt på en tredimensionell RhE-modell som består av icke-transformerade epidermala keratinocyter av humant ursprung som har odlats till att bilda en starkt differentierad modell av human hud i flera lager. Den består av ordnade skikt i form av basallager, taggcellslager och granulärt lager samt ett flerskiktat hornlager innehållande intercellulära lamellära lipidlager av de huvudsakliga lipidklasser som motsvarar dem som förekommer in vivo.
13. Kemiskt inducerad hudirritation, som manifesteras framför allt som hudrodnad och ödem, är resultatet av en händelsekedja som börjar med att kemikalier penetrerar hornlagret, där de kan skada de underliggande lagren av keratinocyter och andra hudceller. De skadade cellerna kan antingen avge inflammatoriska mediatorer eller orsaka en inflammatorisk kaskad som även påverkar cellerna i huden, särskilt stromacellerna och endotelcellerna i

blodkärlen. Det är utvidgningen och den ökade permeabiliteten hos endotelcellerna som ger upphov till de hudrodnader och ödem som kan observeras (29). Vid avsaknad av vaskularisering i in vitro-testsystemet mäter de RhE-baserade testmetoderna kaskadens inledande effekter, t.ex. cell- och vävnadsskador (16) (17) och avläser dessa utifrån cellviabilitet.

14. Cellviabiliteten i RhE-modeller mäts genom enzymatisk omvandling av vitalfärgämnet MTT (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid, tiazolylblått, CAS-nummer 298-93-1), till ett blått salt som mäts kvantitativt efter att det har extraherats från vävnaderna (31). Irriterande kemikalier identifieras genom deras förmåga att minska cellviabiliteten under definierade gränsvärden (dvs. $\leq 50\%$ för kategori 2 enligt GHS och CLP). Beroende på den rättsliga ramen och testmetodens tillämplighet kan testkemikalier som ger cellviabilitet ovanför den definierade tröskelnivån anses vara icke-irriterande (dvs. $> 50\%$, ”ingen kategori”).

DEMONSTRATION AV KOMPETENS

15. Före rutinanvändning av någon av de fyra validerade testmodellerna som hör till denna testmetod (tillägg 2) bör laboratoriet visa teknisk kompetens med hjälp av de tio kvalifikationsämnen som anges i tabell 1. När t.ex. ett listat ämne inte finns tillgängligt kan ett annat ämne som det finns adekvata in vivo- och in vitro-referensdata för (t.ex. från listan med referenskemikalier (8)) användas, förutsatt att samma urvalskriterier tillämpas som de som beskrivs i tabell 1. Användning av ett alternativt kvalifikationsämne måste motiveras.
16. Som en del av kvalitetsförfarandet rekommenderas att användarna efter mottagande av vävnaden verifierar dess barriäregenskaper enligt specifikationerna från RhE-modelltillverkaren. Detta är särskilt viktigt om vävnader transporteras över långa sträckor eller om transporten tar lång tid. När en metod har etablerats på ett framgångsrikt sätt och kvaliteten hos metodanvändningen har påvisats, behöver sådana verifikationer inte göras rutinmässigt. När en metod används rutinmässigt rekommenderas dock att bedömningen av barriäregenskaperna görs med jämna mellanrum.

Tabell 1: Kvalifikationsämnen¹

Ämne	CAS-nr	In vivo-gradering ²	Fysikaliskt tillstånd	GHS-kategori
ICKE-KLASSIFICERADE ÄMNEN (”ingen kategori” enligt GHS)				
naftalenättiksyra	86-87-3	0	Fasta ämnen	Ingen kat.
Isopropanol	67-63-0	0,3	Vätskor	Ingen kat.
metylstearat	112-61-8	1	Fasta ämnen	Ingen kat.
heptylbutyrat	5870-93-9	1,7	Vätskor	Ingen kat. (Valfri kat. 3) ³
hexylsalicylat	6259-76-3	2	Vätskor	Ingen kat. (Valfri kat. 3) ³
KLASSIFICERADE ÄMNEN (GHS-kategori 2)				

cyklamenaldehyd	103-95-7	2,3	Vätskor	Kat. 2
1-bromhexan	111-25-1	2,7	Vätskor	Kat. 2
kaliumhydroxid (5 % vattenlösning)	1310-58-3	3	Vätskor	Kat. 2
1-metyl-3-fenyl-1-piperazin	5271-27-2	3,3	Fasta ämnen	Kat. 2
heptanal	111-71-7	3,4	Vätskor	Kat. 2

1 Kvalifikationsämnen är en underuppsättning kemikalier som används i valideringsstudier, och urvalet baseras på följande kriterier: i) kemikalierna ska finnas tillgängliga i handeln, ii) de ska vara representativa för hela urvalet av Draizes irriteringspoäng (från icke-irriterande till starkt irriterande), iii) de ska ha en väldefinierad kemisk struktur; iv) de ska vara representativa för den kemiska funktionalitet som används i valideringsprocessen, v) de ska ha gett reproducerbara resultat in vitro vid flera tester och i flera laboratorier, vi) de ska ha kunnat förutses korrekt in vitro, och vii) de får inte vara extremt toxiska (t.ex. cancerframkallande eller toxiska för fortplantningssystemet) eller belagda med några kostnader för farligt avfall.

2 In vivo-gradering enligt TM B.4 (4).

3 I denna testmetod betraktas den valfria GHS-kategorin 3 (svagt irriterande ämnen) (1) som "ingen kategori".

FÖRFARANDE

17. Nedan följer en beskrivning av komponenter och förfaranden i en RhE-testmetod för bedömning av hudirritation (se även tillägg 3 för parametrarna i respektive testmodell). Det finns standardiserade tillvägagångssätt (SOP) för de fyra modeller som följer den här testmetoden (32) (33) (34) (35).

RHE-TESTMETOD, KOMPONENTER

Allmänna betingelser

18. Icke-transformerade humana keratinocyter ska användas för rekonstruktion av epitelvävnaden. Det ska finnas flera lager av viabla epitelceller (basallager, taggcellslager och granulärt lager) under ett funktionellt hornlager. Hornlagret ska bestå av flera skikt och innehålla den lipidprofil som krävs för att ge en funktionell barriär som är tillräckligt robust för att stå emot snabb penetrering av cytotoxiska markörkemikalier, t.ex. natriumdodecylsulfat (SDS) eller Triton X-100. Barriärfunktionen bör påvisas och kan bedömas antingen genom bestämning av den koncentration vid vilken markörkemikalien minskar vävnadernas viabilitet med 50 % (IC₅₀) efter en fast exponeringstid eller genom att bestämma den exponeringstid som krävs för att minska cellviabiliteten med 50 % (ET₅₀) vid applicering av en viss fastställd koncentration av markörkemikalien. RhE-modellens inneslutningsegenskaper ska förhindra att material kan passera runt hornlagret till den viabla vävnaden, vilket kan leda till en bristande modellering av hudexponeringen. RhE-modellen får inte vara kontaminerad med bakterier, virus, mykoplasma eller svamp.

Funktionella betingelser

Viabilitet

19. För kvantifiering av vävnadens viabilitet används MTT-testet (31). De viabla cellerna i den konstruerade RhE-vävnaden kan reducera vitalfärgämnet MTT till en fällning av blått MTT-formazan, vilket därefter extraheras från vävnaden med hjälp av isopropanol (eller ett liknande lösningsmedel). Extraktionsmedlets optiska densitet (OD) bör vara tillräcklig låg, dvs. lägre än 0,1. Det extraherade MTT-formazanet kan kvantifieras antingen med hjälp av ett standardmätningssinstrument för absorbering (OD) eller med en HPLC/UPLC-spektrofotometer (36). Användare av RhE-modellen bör se till att varje sats uppfyller de definierade kriterierna för negativ kontroll. Utvecklare/återförsäljare av RhE-modellen ska fastställa godtagbara gränsvärden (med övre och lägre gräns) för de negativa OD-kontrollvärdena (enligt villkoren för testmetoden för hudirritation). I tabell 2 anges de acceptabla gränsvärdena för de fyra validerade RhE-testmodeller som ingår i denna testmetod. Vid användning av en HPLC/UPLC-spektrofotometer ska de negativa OD-kontrollvärden som anges i tabell 2 användas som acceptanskriterier för den negativa kontrollen. Det bör finnas dokumenterat att de vävnader som behandlas med den negativa kontrollen är stabila i odlingar (ger motsvarande resultat vid viabilitetsmätning) under testets hela exponeringsperiod.

Tabell 2: Acceptabla gränsvärden för den negativa kontrollens OD-värden för de testmodeller som ingår i denna testmetod

	Nedre gräns för godkännande	Övre gräns för godkännande
EpiSkin™ (SM)	$\geq 0,6$	$\leq 1,5$
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	$\geq 0,8$	$\leq 2,8$
SkinEthic™ RHE	$\geq 0,8$	$\leq 3,0$
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	$\geq 0,7$	$\leq 2,5$

Barriärfunktion

20. Hornlagret och dess lipidsammansättning ska räcka till för att stå emot snabb penetrering av cytotoxiska markörkemikalier, t.ex. SDS eller Triton X-100, enligt uppskattningar genom IC₅₀ eller ET₅₀ (tabell 3).

Morfologi

21. Histologisk undersökning av RhE-modellen bör göras för att påvisa att strukturen motsvarar human hud (inklusive flerskiktat hornlager).

Reproducerbarhet

22. Resultaten av testning med positiv och negativ kontroll bör påvisa reproducerbarhet över tid.

Kvalitetskontroll

23. Utvecklaren/leverantören av RhE-modellen bör säkerställa och påvisa att varje sats RhE-modell som används uppfyller de fastställda produktkriterierna, där kriterierna för *viabilitet* (punkt 19), *barriärfunktion* (punkt 20) och *morfologi* (punkt 21) är de viktigaste. Dessa

data bör ges till metodanvändarna så att de kan införliva informationen i testrapporten. Godkända värden (inom en övre och en undre gräns) för IC₅₀ eller ET₅₀ ska fastställas av utvecklaren/leverantören av RhE-modellen. Endast resultat som har producerats med kvalificerade vävnader kan godkännas för tillförlitlig beräkning av irritationsklassificering. I tabell 3 anges de acceptabla gränsvärdena för de fyra validerade RhE-testmodeller som ingår i denna TG.

Tabell 3: Kvalitetskriterier för godkännande för de testmodeller som ingår i denna testmetod

	Nedre gräns för godkännande	Övre gräns för godkännande
EpiSkin™ (SM) (18 timmars behandling med SDS) (32)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (33)	ET ₅₀ = 4,0 timmar	ET ₅₀ = 8,7 timmar
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET ₅₀ = 4,0 timmar	ET ₅₀ = 10,0 timmar
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 timmars behandling med SDS) (35)	IC ₅₀ = 1,4 mg/ml	IC ₅₀ = 4,0 mg/ml

Applicering av testkemikalien och kontrollämnen

24. Minst tre vävnadsreplikater ska användas per testkemikalie och för kontrollerna i varje omgång. För vätskor och fasta ämnen appliceras en tillräcklig mängd av testkemikalien så att hudens yta täcks med ett jämnt lager så att en infinit dos undviks. Dosen ska vara minst 26–83 µl/cm² eller mg/cm² (se tillägg 3). För fasta ämnen fuktas hudens yta med avjoniserat eller destillerat vatten före appliceringen för att förbättra kontakten mellan testkemikalien och hudens yta. När det är möjligt ska fasta ämnen testas i form av ett fint pulver. Ett nylonnät kan användas till spridningen i vissa fall (se tillägg 3). Vid slutet av exponeringsperioden tvättas testkemikalien omsorgsfullt bort från hudens yta med buffrad vattenlösning eller 0,9-procentig NaCl. Beroende på vilken RhE-testmodell som används kan exponeringstiden variera från 15 till 60 minuter, och inkubationstemperaturen mellan 20 och 37 °C. Exponeringsperioderna och exponeringstemperaturerna optimeras för varje enskild RhE-testmetod och representerar testmodellernas olika egenskaper (t.ex. barriärfunktion) (se tillägg 3).
25. Negativa kontroller (NC) och positiva kontroller (PC) ska användas parallellt vid varje testomgång för att visa att viabiliteten (med NC) samt barriärfunktionen och den resulterande känsligheten (med PC) hos vävnaderna ligger inom fastställda godkända historiska värden. För den positiva kontrollen föreslås 5-procentig vattenlösning av natriumdodecylsulfat. För den negativa kontrollen föreslås vatten eller fosfatbuffrad saltlösning.

Mätning av cellernas viabilitet

26. Den viktigaste faktorn i testningsförfarandet är att viabilitetsmätningarna inte utförs omedelbart efter exponeringen för testkemikalien, utan först efter att de sköljda vävnaderna har haft en tillräckligt lång inkubationstid i färskt medium efter behandlingen. Under denna period kan vävnaderna antingen återhämta sig från svagt irriterande effekter eller utveckla tydliga cytotoxiska effekter. En inkubationsperiod på 42 timmar efter behandling har visat sig vara det optimala efter testoptimering av två av de RhE-baserade testmodeller som ligger till grund för denna testmetod (11) (12) (13) (14) (15).
27. MTT-metoden är en validerad kvantitativ metod som ska användas i denna testmetod för att mäta cellviabiliteten. Den kan användas på en tredimensionell vävnadsmodell. Vävnadsprovet placeras i en MTT-lösning av lämplig koncentration (t.ex. 0,3–1 mg/ml) i 3 timmar. De viabla cellerna omvandlar MTT till blått formazan. Fällningen i form av blått formazan extraheras sedan från vävnaden med ett lösningsmedel (t.ex. isopropanol, sur isopropanol), och formazankoncentrationen mäts genom bestämning av OD vid 570 nm med ett filterbandpass på högst ± 30 nm eller med hjälp av en HPLC/UPLC-spektrofotometerprocedur (se punkt 34) (36).
28. Testkemikaliens optiska egenskaper eller kemiska verkan på MTT kan störa bestämningen, vilket leder till en felaktig uppskattning av viabiliteten (testkemikalien kan förhindra eller vända färgutvecklingen, men kan även vara orsaken till den). Detta kan ske när en specifik testkemikalie inte avlägsnas fullständigt från vävnaden genom sköljning eller när den penetrerar överhuden. Om testkemikalien verkar direkt på MTT (t.ex. genom att reducera MTT), är naturligt färgad eller färgas under behandlingen av vävnaden, bör ytterligare kontroller göras så att man kan upptäcka och korrigera för testkemikaliens störande inverkan på tekniken för mätning av viabiliteten (se punkterna 29 och 33). Detaljerad beskrivning hur direkt MTT-reduktion och störningar av färgämnen kan korrigeras finns i de operativa standardförfarandena för de tre validerade metoderna (32) (33) (34) (35).
29. För att identifiera vilka av testkemikalierna som reducerar MTT bör de tillsättas en och en till ett nypreparerat MTT-medium. Om MTT-blandningen som innehåller testkemikalien färgas blå/lila kan testkemikalien antas reducera MTT direkt och då bör en ytterligare funktionskontroll utföras på icke-viabel hud, oberoende av om en standardmätningssmetod för absorbering (OD) eller en HPLC/UPLC-spektrofotometerprocedur har använts. I nämnda funktionskontroll ska död vävnad användas som endast har residual metabolisk aktivitet men som kan absorbera testkemikalien på ett liknande sätt som viabla vävnader. Varje testkemikalie som reducerar MTT ska appliceras på minst två döda vävnadsreplikater vilka sedan genomgår hela testproceduren för att generera icke-specifik MTT-reduktion (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Det räcker med en enda NSMTT-kontroll per testkemikalie oavsett antalet oberoende test/omgångar som genomförs. Därefter beräknas vävnadens faktiska viabilitet utifrån procentandelen viabel vävnad som har exponerats för en MTT-reducerare minus procentandelen icke-specifik MTT-reduktion som erhålls från den döda vävnad som har exponerats för samma MTT-reducerare, och detta beräknas genom en

jämförelse med den negativa kontroll som gjorts parallellt för det test som korrigeras (%NSMTT).

30. För att identifiera potentiell interferens av färgade testkemikalier eller av testkemikalier som färgas vid kontakt med vatten eller isopropanol och för att kunna avgöra om ytterligare kontroller behövs bör en spektral analys av testkemikalien utföras i vatten (miljö under exponering) och/eller i isopropanol (extraherande lösningsmedel). Om testkemikalien, när den ligger i vatten och/eller isopropanol, absorberar ljus inom ett intervall på 570 ± 30 nm bör ytterligare färgningskontroller utföras, och om sådana kontroller inte behövs bör en HPLC/UPLC-spektrofotometerprocedur användas (se punkterna 33 och 34). Vid standardmätning av absorberingsgraden (OD) ska varje färgad interfererande testkemikalie appliceras på minst två viabla vävnadsreplikater per exponering, och dessa ska genomgå hela testet men ska inkuberas med ett medium i stället för en MTT-lösning under MTT-inkuberingsfasen för att generera en icke-specifik färgkontroll (NSC_{living}). NSC_{living}-kontrollen ska utföras parallellt med testningen av den färgade testkemikalien, och när flera tester utförs krävs en oberoende NSC_{living}-kontroll för varje genomfört test (i varje omgång) beroende på den levande vävnadens inneboende biologiska mångfald. Därefter beräknas vävnadens faktiska viabilitet efter procentandelen levande vävnad som erhålls efter det att den levande vävnaden har exponerats för en interfererande testkemikalie och inkuberats med en MTT-lösning minus procentandelen icke-specifik färg som erhålls från levande vävnad som har exponerats för den interfererande testkemikalien och inkuberats i ett medium utan MTT, parallellt med det test som korrigeras (%NSC_{living}).
31. Testkemikalier som bedöms producera både direkt MTT-reduktion (se punkt 29) och färginterferens (se punkt 30) kräver en tredje typ av kontroller utöver de NSMTT- och NSC_{living}-kontroller som beskrivs ovan vid genomförande av standardmätningar av absorberingsgrad (OD). Detta är vanligtvis fallet med mörkt färgade testkemikalier som interfererar med MTT-testet (t.ex. blå, lila, svart) eftersom deras naturliga färg gör det omöjligt att bedöma om de reducerar MTT direkt så som beskrivs i punkt 29. Dessa testkemikalier kan bindas till både levande och död vävnad, och en NSMTT-kontroll kan då utöver att korrigera den potentiella direkta MTT-reduktionen även korrigera den färginterferens som uppstår när testkemikalien binds till död vävnad. Detta kan leda till en dubbel korrigering av färginterferens eftersom NSC_{living} redan korrigerar färginterferens som uppstår när testkemikalien binds till levande vävnad. För att undvika dubbel korrigering av färginterferens krävs en tredje kontroll anpassad för icke-specifik färg i död vävnad (NSC_{killed}). Vid nämnda kontroll appliceras testkemikalien på minst två döda vävnadsreplikater vilka sedan genomgår hela testproceduren men inkuberas i ett medium i stället för i en MTT-lösning under MTT-inkubationsfasen. Det räcker med en enda NSC_{killed}-kontroll per testkemikalie oavsett antalet oberoende test/omgångar som har utförts, men kontrollen bör genomföras parallellt med NSMTT-kontrollen och, om det är möjligt, med samma sats av vävnadsprover. Därefter beräknas vävnadens faktiska viabilitet efter procentandelen levande vävnad som erhålls efter det att den levande vävnaden har exponerats för en interfererande testkemikalie och inkuberats med en MTT-lösning minus

%NSMTT minus %NSC_{living} plus procentandelen icke-specifik färg som erhålls från levande vävnad som har exponerats för den interfererande testkemikalien och inkuberats i ett medium utan MTT, beräknat efter den negativa kontroll som utförts parallellt med det test som korrigeras (%NSC_{killed}).

32. Observera att icke-specifik MTT-reduktion och icke-specifik färginterferens kan öka avläsningen av vävnadsprovet så att det överskrider spektrofotometerns linjeintervall. Laboratoriet ska därför fastställa spektrofotometerns linjära område med MTT-formazan (CAS-nr 57360-69-7) från en kommersiell källa innan försök med testkemikalier för lagstadgade ändamål inleds. En standardmätning av absorberingsgrad (OD) med hjälp av en spektrofotometer är lämplig för bedömning av vilka kemikalier som direkt reducerar MTT eller orsakar färginterferens i de fall vävnadsproverna, utan att ha korrigerats för direkt MTT-reduktion och/eller färginterferens, ger OD-värden som ligger inom spektrofotometerns linjeintervall eller i de fall testkemikalien ger en procentandel viabilitet som redan före korrigering är ≤ 50 %. Dock bör resultat från testkemikalier som producerar %NSMTT och/eller %NSC_{living} som är ≥ 50 % av den negativa kontrollen beaktas med försiktighet, eftersom detta är det gränsvärde som används för att skilja klassificerade kemikalier från icke-klassificerade (se punkt 36).
33. För färgade testkemikalier som inte är kompatibla med standardmätningen för absorberingsgrad (OD) på grund av alltför stark interferens vid MTT-testet kan en alternativ HPLC/UPLC-spektrofotometerprocedur användas (se punkt 34) (36). HPLC/UPLC-spektrofotometersystemet gör det möjligt att separera MTT-formazanet från testkemikalien före kvantifiering (36). Därför behövs aldrig NSC_{living} eller NSC_{killed}-kontroller vid användning av HPLC/UPLC-spektrofotometerteknik oberoende av vilken kemikalie som testas. NSMTT-kontroller ska dock användas när det finns misstankar om att testkemikalien reducerar MTT direkt eller när den har en färg som gör det omöjligt att bedöma huruvida den kan reducera MTT direkt (enligt beskrivningen i punkt 29). Vid användning av en HPLC/UPLC-spektrofotometer för att mäta MTT-formazan beräknas vävnadens viabilitet som procentandelen topparea för MTT-formazan som erhållits med levande vävnad exponerad för testkemikalien, jämfört med procentandelen MTT-formazan-topparea som erhållits med parallellt utförda negativa kontroller. För testkemikalier som kan reducera MTT direkt beräknas vävnadens viabilitet genom den levande vävnadens viabilitet i procent minus %NSMTT. Slutligen bör nämnas att kemikalier som direkt reducerar MTT även kan orsaka färginterferens, vilken stannar kvar i vävnaden efter behandling och reducerar MTT så starkt att de orsakar OD-värden (påvisbart genom OD-standardmätning) eller toppareor (påvisbart genom användning av en UPLC/HPLC-spektrofotometer) på de testade vävnadsextrakt som faller utom spektrofotometerns linjeintervall och därför inte kan bedömas. Detta är dock väldigt ovanligt.
34. HPLC/UPLC-spektrofotometersystem kan användas för att mäta MTT-formazan för alla typer av testkemikalier (färgade, icke-färgade, de som reducerar MTT och de som inte gör det) (36). Eftersom det finns flera olika typer av HPLC/UPLC-spektrofotometersystem ska

systemets lämplighet visas innan det används för att kvantifiera MTT-formazan från vävnadsextrakt genom att systemet uppfyller acceptanskriterierna för en uppsättning standardkvalifikationsparametrar som baseras på dem som har beskrivits i USA. Livsmedelsverkets riktlinjer för bioanalytisk metodvalidering inom industrin (36)(37). Dessa nyckelparametrar och deras acceptanskriterier anges i tillägg 4. När de acceptanskriterier som anges i tillägg 4 är uppfyllda ska HPLC/UPLC-spektrofotometersystemet anses vara godkänt och färdigt att användas för mätning av MTT-formazan under de testbetingelser som beskrivs i denna testmetod.

Acceptanskriterier

35. För varje metod där giltiga RhE-modellsatser används (se punkt 23) ska de vävnader som behandlats med negativ kontroll visa ett OD-värde som avspeglar kvaliteten på vävnader som har följt alla transport- och mottagningsförfaranden och alla protokollprocesser. Kontrollernas OD-värden bör inte ligga under de historiskt fastställda gränserna. På samma sätt ska vävnader som behandlats med en PC, dvs. 5 % vattenlöslig SDS, återspegla vävnadernas responsförmåga på en irriterande kemikalie under de förhållanden som föreligger för testmetoden (se tillägg 3; för ytterligare information om SOP för de testmodeller som ingår i detta test se (32) (33) (34) (35)). Variabilitetsmätningar av skillnader mellan vävnadsreplikater, dvs. av standardavvikelser (SD), bör ge resultat som ligger inom de fastställda acceptansgränserna för testmodellen ifråga (se tillägg 3).

Tolkning av resultaten och prediktionsmodell

36. De OD-värden som erhålls för varje testkemikalie kan användas för att beräkna procentuell viabilitet jämfört med den negativa kontrollen, som fastställs till 100 %. Vid användning av en HPLC/UPLC-spektrofotometer beräknas vävnadens viabilitet som procentandelen topparea för MTT-formazan som erhållits med levande vävnad exponerad för testkemikalien, jämfört med procentandelen MTT-formazan-topparea som erhållits med parallellt utförda negativa kontroller. Det procentuella viabilitetsgränsvärdet skiljer irriterande testkemikalier från icke-klassificerade testkemikalier, och det eller de statistiska förfarande(n) som används för att utvärdera resultaten och identifiera irriterande ämnen ska vara klart definierade och dokumenterade och ska vara bevisat lämpliga (se testmodellernas SOP för mer information). Gränsvärdena för förutsägelse av irritation anges nedan:
 - Testkemikalien identifieras som en kemikalie som kräver klassificering och märkning enligt GHS/CLP (kategori 2 eller kategori 1) om vävnadens genomsnittliga viabilitet efter exponering och efterföljande inkubation är lägre eller lika med ($\leq$) 50 %. Eftersom RhE-testmodellerna i denna testmetod inte kan skilja mellan kategorierna 1 och 2 i GHS/CLP krävs ytterligare information om hudkorrosion för att avgöra den slutliga kemikalieklassen (se även OECD:s vägledningsdokument om IATA (3)). Om testkemikalien bedöms vara icke-korrosiv (t.ex. utifrån TM.40, B.40a eller B.65) och uppvisar en vävnadsviabilitet på

lägre eller lika med ($\leq$) 50 % efter exponering och efterföljande inkubation ska testkemikalien klassas som irriterande för huden, i enlighet med GHS/CLP-kategori 2.

- Beroende på lagstiftningen i respektive medlemsland kan testkemikalien anses vara icke-irriterande för huden, alltså "ingen kategori" enligt GHS/CLP, om vävnadsviabiliteten efter exponering och efterbehandlingsinkubation ligger över ($>$) 50 %.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

37. För varje omgång ska data från enskilda vävnadsreplikater (t.ex. OD-värden och data om beräknad procentuell cellviabilitet för varje testkemikalie, inklusive klassificering) rapporteras i tabellform, i tillämpliga fall även data från upprepade försök. Dessutom ska medelvärden $\pm$ standardavvikelser för varje omgång rapporteras. Observerade interaktioner med MTT-reagenset och färgade testkemikalier ska rapporteras för varje testad kemikalie.

Testrapport

38. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie och kontrollkemikalier:

- Monokomponentämne: kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.
- Multikomponentämne, UVCB och blandningar: Karakteriseras så långt som möjligt genom kemisk beteckning (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.
- Fysikaliskt tillstånd, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.
- Ursprung, satsnummer om sådant finns.
- Behandling av test-/kontrollkemikalierna före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).
- Testkemikaliens stabilitet, sista förbrukningsdatum eller sista datum för upprepade analys, om känt.
- Lagringsförhållanden.

Vilken RhE-modell och vilket protokoll som har använts (samt motivering, i förekommande fall).

Testbetingelser:

- RhE-modell (inklusive satsnummer).
- Kalibreringsinformation för mätningssinstrument (t.ex. spektrofotometer, våglängd och filterbandpass (i förekommande fall) som har använts för kvantifiering av MTT-formazan, samt mätinstrumentets linjeintervall. Beskrivning av den metod som har använts för att kvantifiera MTT-formazan.
- Beskrivning av kvalitetsbestämningen av HPLC/UPLC-spektrofotometersystemet (i förekommande fall). Fullständig stödjande information för den specifika RhE-modell som använts, inklusive modellens prestanda. Informationen ska omfatta men inte vara begränsad till följande:
 - i) viabilitet,
 - ii) barriärfunktion,
 - iii) morfologi,
 - iv) reproducerbarhet och förutsägbarhet,
 - och v) kvalitetskontroller av modellen.
- Hänvisning till historiska uppgifter om modellen. I denna hänvisning ska bland annat framgå huruvida kvalitetskontrolluppgifterna är godtagbara med avseende på historiska uppgifter om respektive använd sats.
- Demonstrationen av kompetens för utförande av testmetoden ska göras före rutinanvändning, genom testning av kvalifikationsämnen.

Provningsförfarande:

- Detaljerad beskrivning av testet (inklusive tvättning efter exponering). Dosen för testkemikalien respektive kontrollkemikalier.
- Exponeringstid och exponeringstemperatur samt inkubationsperiod efter exponering.
- Uppgifter om kontroller som använts för direkt MTT-reduktion och/eller färgade testkemikalier, i förekommande fall.
- Antal vävnadsreplikat som använts per testkemikalie och kontroll (PC, negativa kontroller och NSMTT, NSC_{living} och NSC_{killed}, i förekommande fall).
- Beskrivning av beslutskriterierna/den prediktionsmodell som använts beroende på RhE-modell.
- Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet (inklusive tvättningsförfarandet).

Acceptanskriterier för testet och omgången:

- Medelvärden och godtagbara intervall för parallella positiva och negativa kontroller på grundval av historiska data. Acceptabel variabilitet mellan vävnadsreplikaten för negativa och positiva kontroller.
- Acceptabel variabilitet mellan vävnadsreplikaten som behandlats med testkemikalien.

Resultat:

- Redovisning i tabellform av individuella testkemikalier för varje testomgång och replikatmätning inklusive OD-värden eller toppareor för MTT-formazan, vävnadsviabilitet i procent, vävnadens medelviabilitet i procent samt standardavvikelse.
- I förekommande fall även resultaten från de kontroller som använts för ämnen som direkt reducerar MTT och/eller för färgande testkemikalier, inklusive OD-värden eller toppareor för MTT-formazan, %NSMTT, %NSC_{living}, %NSC_{killed}, standardavvikelse och den slutliga korrekta vävnadsviabiliteten i procent.
- Resultaten för testkemikalier och kontrollkemikalie utifrån definierade acceptanskriterier för omgången och testet.
- Beskrivning av övriga observerade effekter.
- Härledda klassificeringar med hänvisning till förekommande prediktionsmodell/beslutskriterier.

Diskussion av resultaten

Slutsatser

LITTERATURHÄNVISNINGAR

- (1) Förenta nationerna (FN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), andra reviderade utgåvan, FN New York och Genève, 2013. Tillgänglig på: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) EURL-ECVAM (2009). Uttalande om "Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards", utfärdat av ECVAM:s vetenskapliga rådgivande kommitté (ESAC31), 9 april 2009. Tillgänglig på: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf
- (3) OECD (2014). Vägledningsdokument om ett integrerat synsätt på testning och bedömning av hudirritation/hudkorrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 203, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (4) Kapitel B.4 i denna bilaga, Akut hudirritation/hudkorrosion.
- (5) Kapitel B.40 i denna bilaga, Hudkorrosion in vitro: Transkutant elektriskt motstånd (TER).
- (6) Kapitel B.40a i denna bilaga, Hudkorrosion in vitro: Testmetod med rekonstruerad human epidermis (RhE).
- (7) Kapitel B.65 i denna bilaga, In vitro-membranbarriärtest för hudkorrosion.
- (8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 34, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. och Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.

- (11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. och Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.
- (12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. och Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, s. 107–114.
- (13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.
- (14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. och Rubinstein, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, s. 329–349.
- (15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. och Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.
- (16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. och Zuang, V. (2007). ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.
- (17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1- α .
- (18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. och Zuang, V. (2007). ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, s. 603–619.
- (19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonnaud, E. och Leclaire, J. (2007). *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy – Results and performances with 184 cosmetic ingredients, *AATEX*, Special Issue-proceedings from WC6. vol. 14, s. 351–358.

- (20) EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, utfärdat av ECVAM:s vetenskapliga rådgivande kommitté (ESAC26), den 27 april 2007. Tillgänglig på: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf
- (21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *Anm. Detta är de ursprungliga PS som använts för validering av de två testmetoderna. Dessa PS ska inte användas längre eftersom det nu finns en uppdaterad version (8).*
- (22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf
- (23) OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment nr 137, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. och Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol Sci*, vol. 34, s. 327–334.
- (25) Katoh, M. och Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, vol. 16, s. 111–122.
- (26) OECD (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 159, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (27) OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 155, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. och Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin

- Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.
- (29) Welss, T., Basketter, D.A. och Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* kapitel 18, s. 231–243.
 - (30) Eskes C. m.fl. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* vol. 62, s. 393–403.
 - (31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* vol. 65, s. 55–63.
 - (32) EpiSkin™ (februari 2009). SOP, Version 1.8 ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals
 - (33) EpiDerm™ (omarbetad i mars 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).
 - (34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.
 - (35) LabCyte (juni 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model “LabCyte EPI-MODEL24”
 - (36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Manus under bearbetning.
 - (37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Maj 2001. Tillgänglig på: [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>].
 - (38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., och Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, i: Practical Contact Dermatitis, s. 7–18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

- (39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *Anm. Detta är den nu gällande versionen av ECVAM:s PS, uppdaterad 2009 för genomförandet av GHS. Dessa PS ska inte användas längre eftersom det nu finns en uppdaterad version för gällande riktlinjer (8).*
- (40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.
- (41) Europeiska kommissionen (2001). Kommissionens direktiv 2001/59/EG av den 6 augusti 2001 om anpassning till tekniska framsteg för tjugoåttonde gången av rådets direktiv 67/548/EEG om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen (EGT L 225, 21.8.2001, s. 1).

Tillägg 1

DEFINITIONER

Noggrannhet: Ett mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Exakthet är ett mått på testmetodens prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (9).

Cellviabilitet: en parameter för att mäta den totala aktiviteten hos en cellpopulation, t.ex. förmågan hos cellernas mitokondriella dehydrogenaser att reducera vitalfärgämnet MTT (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid, tiazolylblått). Denna aktivitet korrelerar, beroende på vilken endpoint som mäts och vilken testutformning som används, med det totala antalet levande celler och/eller dessa cellers vitalitet.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Konkordans: ett mått på testmetodens prestanda för sådana testmetoder som ger kategoriska resultat, och en aspekt av relevans. Termen används ibland omväxlande med exakthet och definieras som andelen av alla testade kemikalier som klassificeras korrekt som positiva eller negativa. Konkordansen är direkt beroende av förekomsten av positiva värden i den testkemikalie som undersöks (9).

ET₅₀: Uppskattas genom bestämning av den exponeringstid som krävs för att minska cellviabiliteten med 50 % efter applicering av markörkemikalien vid en angiven, fast koncentration; se även IC₅₀.

GHS (FN:s globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier): ett system för att klassificera kemikalier (ämnen och blandningar) enligt standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker, och informera om resultaten genom t.ex. piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad i syfte att informera om kemikaliernas skadliga effekter för att skydda personer (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) samt miljön (1).

HPLC: högupplösande vätskekromatografi.

IATA: ett integrerat synsätt på testning och bedömning.

IC₅₀: kan uppskattas genom bestämning av den koncentration vid vilken en markörkemikalie minskar vävnadernas viabilitet med 50 % (IC₅₀) efter en fast exponeringstid; se även ET₅₀.

Infini dos: den mängd testkemikalie som applicerats på huden som överstiger den mängd som krävs för att helt täcka hudens yta med ett jämnt lager.

Blandning: blandning eller lösning som består av två eller flera ämnen.

Monokomponentämne: ett ämne, definierat av sin kvantitativa sammansättning, där en huvudsaklig beståndsdel utgör minst 80 viktprocent.

MTT: 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid, tiazolylblått-tetrazoliumbromid.

Multikomponentämne: ett ämne, definierat av sin kvantitativa sammansättning, där mer än en huvudsaklig beståndsdel förekommer i en koncentration på ≥ 10 viktprocent och < 80 viktprocent. Ett multikomponentämne är resultatet av en tillverkningsprocess. Skillnaden mellan blandningar och multikomponentämnen är att en blandning erhålls genom att två eller flera ämnen blandas utan kemisk reaktion. Ett multikomponentämne är resultatet av en kemisk reaktion.

NSC_{killed}: kontroll för icke-specifik färg i döda vävnader.

NSC: kontroll för icke-specifik färg i levande vävnader.

NSMTT: icke-specifik MTT-reduktion.

Prestandastandarder (PS): standarder som baseras på en validerad testmetod och som utgör grunden för utvärdering av jämförbarheten för en föreslagen testmetod som är mekaniskt och funktionellt likartad. Följande ingår: i) testmetodens grundläggande komponenter, ii) en minimiförteckning med referenskemikalier som valts ut från de kemikalier som använts för att påvisa att den validerade metoden fungerar tillfredsställande, och iii) de jämförbara nivåer av exakthet och tillförlitlighet, på grundval av vad som erhållits för den validerade testmetoden, som man bör kunna påvisa för den föreslagna testmetoden när den utvärderas med användning av minimiförteckningen med referenskemikalier (9).

PC: positiv kontroll: ett replikat som innehåller testsystemets alla komponenter och behandlas med en kemikalie som man vet inducerar positiv respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsens variationer kan bedömas över tid, bör den kraftiga irritation som framkallas inte vara överdriven.

Relevans: en beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida detta förhållande är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl testet korrekt kan mäta och förutse den biologiska effekt det gäller. Relevans omfattar också överväganden om en testmetods noggrannhet (konkordans) (9).

Tillförlitlighet: mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tid när den utförs med hjälp av samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier (9).

Ersättningstest: ett test som är utformat att ersätta ett test som används rutinmässigt och som är godkänt för faroidentifiering och/eller riskbedömning och som har konstaterats ge motsvarande eller bättre skydd av människors eller djurs hälsa eller miljön, enligt det som är tillämpligt, jämfört med det godkända testet, för alla tänkbara testningssituationer och kemikalier (9).

Testomgång: en eller flera testkemikalier som testas parallellt med en negativ kontroll och med en PC.

Sensitivitet: den andel av alla positiva/aktiva testkemikalier som klassificeras korrekt genom testet. Sensitiviteten är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (9).

Hudirritation in vivo: när en reversibel skada uppstår på huden efter applicering av en testkemikalie i upp till fyra timmar. Hudirritation är en lokal reaktion hos den berörda hudvävnaden som uppstår kort tid efter stimulering (38). Den orsakas av en lokal inflammatorisk reaktion i vävnadens naturliga (icke-specifika) immunsystem. Den mest utmärkande egenskapen är den reversibla processen som omfattar inflammatoriska reaktioner och de flesta av de kliniskt karakteristiska tecknen på irritation (hudrodnad, ödem, klåda och smärta) som hör samman med en inflammatorisk process.

Specificitet: den andel av alla negativa/inaktiva testkemikalier som klassificeras korrekt genom testet. Specificiteten är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (9).

Ämne: kemiskt grundämne och föreningar av detta grundämne i naturlig eller tillverkad form, inklusive de eventuella tillsatser som är nödvändiga för att bevara dess stabilitet och sådana föroreningar som härrör från tillverkningsprocessen, men exklusive eventuella lösningsmedel som kan avskiljas utan att det påverkar ämnets stabilitet eller ändrar dess sammansättning.

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

UPLC: ultrahögupplösande vätskekromatografi.

UVCB-ämne: ämne med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter och biologiskt material.

Tillägg 2

TESTMODELLER SOM INGÅR I DENNA TESTMETOD

Nr	Testmodellens namn	Typ av valideringsstudie	Källor
1	EpiSkin™	Fullständig prospektiv valideringsstudie (2003–2007). Komponenterna i denna modell användes för att definiera de essentiella testmetodkomponenterna i den ursprungliga respektive den uppdaterade ECVAM PS (39) (40) (21)*. Data från metoden beträffande identifiering av icke klassificerade respektive klassificerade ämnen utgjorde dessutom den viktigaste grunden för att definiera specificitet och sensitivitet i de ursprungliga PS*.	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (original): Testmodellen genomgick en fullständig prospektiv valideringsstudie med nr 1 under åren 2003–2007. Komponenterna i denna modell användes för att definiera de essentiella testmetodkomponenterna i den ursprungliga respektive den uppdaterade ECVAM PS (39) (40) (21)*. EpiDerm™ SIT (EPI-200): En modifierad version av den ursprungliga EpiDerm™ validerades med hjälp av ECVAM:s ursprungliga PS (21) 2008*.	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Valideringsstudie baserad på ECVAM:s ursprungliga prestandastandarder (21) 2008*.	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Valideringsstudie (2011–2012) baserad på prestandastandarderna (PS) i OECD TG 439 (8), vilka i sin tur baseras på ECVAM:s uppdaterade PS* (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) samt PS i denna TG (8)*

*) ECVAM:s ursprungliga prestandastandarder (PS) (21) utvecklades 2007 efter den prospektiva valideringsstudie (16) som bedömde prestandan hos testmodellerna nr 1 och 2 utefter det klassificeringssystem som beskrivs i det tjugooåttonde tillägget till EU:s direktiv om farliga ämnen (41). År 2008 introducerades GHS (1) och EU:s CLP vilket medförde en effektivisering av gränsvärdet för att skilja klassificerade kemikalier från icke-klassificerade, utifrån en in vivo-gradering från 2,0 till 2,3. Exakthetsvärdena och listan över referenskemikalier i ECVAM:s PS uppdaterades 2009 för att anpassas till den nya lagstiftningen (2) (39) (40). I likhet med de ursprungliga PS baserades de uppdaterade PS till stor del på data från modell 1 och 2 (16), men dessutom använde data om referenskemikalier från modell 3. År 2010 användes ECVAM:s uppdaterade PS för att slå fast PS för denna TG (8). När det gäller denna testmetod anses EpiSkin™ utgöra metodens VRM, eftersom den använts för att utveckla samtliga av metodens PS-kriterier. Detaljerad information om valideringsstudierna, en datasammanställning samt bakgrunden till de nödvändiga anpassningar som gjorts av PS på grund av genomförandet av GHS/CLP finns i ECVAM/BfR:s förklarande bakgrundsdocument till motsvarande OECD TG 439 (23).

SIT: hudirritationstest

RhE: rekonstruerad human epidermis

Tillägg 3

SPECIFIKA PROTOKOLLPARAMETRAR FÖR VARJE TESTMODELL SOM INGÅR I DENNA TESTMETOD

RhE-modellerna har snarlika protokoll, och det är värt att notera att alla använder sig av en period efter inkubation på 42 timmar (32) (33) (34) (35). Skillnaderna finns framför allt i de tre parametrar som har med testmodellernas barriärfunktioner att göra och listas här nedan: A) tid och volym före inkubation, B) applicering av testkemikalier och C) volym efter inkubation.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Förinkubation				
Inkubationstid	18–24 timmar	18–24 timmar	< 2 timmar	15–30 timmar
Mediets volym	2 ml	0,9 ml	0,3 eller 1 ml	0,5 ml
B) Applicering av testkemikalien				
För vätskor	10 µl (26 µl/cm²)	30 µl (47 µl/cm²)	16 µl (32 µl/cm²)	25 µl (83 µl/cm²)
För fasta ämnen	10 mg (26 mg/cm²) + DW (5 µl)	25 mg (39 mg/cm²) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm²) + DW (10 µl)	25 mg (83 mg/cm²) + DW (25 µl)
Användning av nylonnät	Används inte	Vid behov	Applicerad	Används inte
Total appliceringstid	15 minuter	60 minuter	42 minuter	15 minuter
Appliceringstemperatur	rumstemperatur	a) i 25 minuter vid rumstemperatur b) i 35 minuter vid 37 °C	rumstemperatur	rumstemperatur
C) Volym efter inkubation				
Mediets volym	2 ml	0,9 ml × 2	2 ml	1 ml
D) Maxgräns för variabilitet				
Standardavvikelse mellan vävnadsreplikaten	SD18	SD18	SD18	SD18

RT: rumstemperatur

DW: destillerat vatten

DPBS: Dulbeccos fosfatbuffrade saltlösning

Tillägg 4

NYCKELPARAMETRAR OCH ACCEPTANSKRITERIER FÖR KVALIFICERING AV HPLC/UPLC-SPEKTROFOTOMETERSYSTEM FÖR MÄTNING AV MTT-FORMAZAN SOM EXTRAHERATS UR RHE-VÄVNADER

Parametrar	Protokoll från FDA:s vägledning (36) (37)	Acceptanskriterier
Selektivitet	Analys av isopropanol, blanka levande kontroller (isopropanolextrakt från obehandlad levande RhE-vävnad), blanka döda kontroller (isopropanolextrakt från obehandlad död RhE-vävnad)	$\text{Område}_{\text{interferens}} \leq 20 \% \text{ av område}_{\text{LLOQ}}^1$
Precision	Kvalitetskontroller (dvs. MTT-formazan vid 1,6 µg/ml, 16 µg/ml och 160 µg/ml) i isopropanol (n = 5)	$\text{CV} \leq 15 \% \text{ eller } \leq 20 \% \text{ för LLOQ-området}$
Noggrannhet	Kvalitetskontroller i isopropanol (n = 5)	$\% \text{Dev} \leq 15 \% \text{ eller } \leq 20 \% \text{ för LLOQ}$
Matriseffekt	Kvalitetskontroller i blanka levande kontroller (n = 5)	$85 \% \leq \text{matriseffekt i } \% \leq 115 \%$
Återföring (carry over)	Analys av isopropanol efter ULOQ ² -standard	$\text{Område}_{\text{interferens}} \leq 20 \% \text{ av område}_{\text{LLOQ}}$
Reproducerbarhet (över dagen)	Tre oberoende kalibreringskurvor (baserade på sex på varandra följande spädningar av MTT-formazan i isopropanol (1:3) med start i ULOQ, dvs. 200 µg/ml) Kvalitetskontroller i isopropanol (n = 5)	Kalibreringskurvor: $\% \text{Dev} \leq 15 \% \text{ eller } \leq 20 \% \text{ för LLOQ}$ Kvalitetskontroller: $\% \text{Dev} \leq 15 \% \text{ och } \text{CV} \leq 15 \%$
Reproducerbarhet (från dag till dag)	Dag 1: En kalibreringskurva och kvalitetskontroller i isopropanol (n = 3) Dag 2: En kalibreringskurva och kvalitetskontroller i isopropanol (n = 3) Dag 3: En kalibreringskurva och kvalitetskontroller i isopropanol (n = 3)	
MTT-formazanets kortsiktiga stabilitet i RhE-vävnadsextrakt	Kvalitetskontroller i blanka levande kontroller (n = 3) som analyserats på dagen för beredningen samt efter 24 timmars förvaring i rumstemperatur	$\% \text{Dev} \leq 15 \%$
MTT-formazanets långsiktiga stabilitet i RhE-vävnadsextrakt, i förekommande fall	Kvalitetskontroller i blanka levande kontroller (n = 3) som analyserats på dagen för beredningen samt efter flera dagars förvaring vid en specifik temperatur (t.ex. 4 °C, -20 °C, -80 °C)	$\% \text{Dev} \leq 15 \%$

¹ LLOQ: Undre kvantifieringsgräns definierad för att omfatta 1–2 % vävnadsviabilitet, dvs. 0,8 µg/ml.

² ULOQ: Övre kvantifieringsgräns, definierad för att vara minst dubbel så hög som den högsta förväntade koncentrationen av MTT-formazan i isopropanolextrakt från negativa kontroller, dvs. 200 µg/ml.”

8) I del B ska följande kapitel läggas till:

”B.63 SCREENINGTEST FÖR REPRODUKTIONS-/UTVECKLINGSTOXICITET

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 421 (2016). OECD:s riktlinjer för kemikalietestning utvärderas med jämna mellanrum som en anpassning till den vetenskapliga utvecklingen. De ursprungliga riktlinjerna för screeningtest (421) antogs 1995, utifrån ett protokoll för ett preliminärt screeningtest för reproduktionstoxicitet som diskuterats vid två expertmöten, i London 1990 (1) och Tokyo 1992 (2).
2. Denna testmetod har uppdaterats med endpoints som är relevanta för hormonstörande ämnen, och detta är en uppföljning till den högprioriterade verksamhet som OECD inledde 1998 för att revidera befintliga testriktlinjer och ta fram nya riktlinjer för screening och testning av potentiella hormonstörande ämnen (3). OECD TG 407 (28-dagars toxicitetsstudie med upprepad oral dosering på gnagare, kapitel B.7 i denna bilaga) utökades till exempel 2008 med parametrar för att påvisa endokrin aktivitet hos testkemikalier. Syftet med uppdateringen av TG 421 var att inkludera några endpoints som är relevanta för hormonstörande ämnen i riktlinjerna för screeningtester där exponeringsperioderna omfattar några av de känsliga utvecklingsperioderna (pre- eller tidiga postnatalperioder).
3. De nya utvalda endpoints som är relevanta för hormonstörande ämnen och som också ingår i TG 443 (utökad enkelgenerationsstudie av reproduktionstoxicitet, motsvarande kapitel B.56 i denna bilaga) inkluderades i TG 421 på grundval av en förstudie som behandlade vetenskapliga och tekniska aspekter av deras inkluderande samt nödvändiga anpassningar av testets utformning för att möjliggöra ett inkluderande (4).
4. Denna testmetod är utformad för att generera begränsad information om en testkemikalies effekter på den hanliga och honliga fortplantningsförmågan, t.ex. beträffande könskörtlarnas funktion, parningsbeteende, befruktning, embryoutveckling och födsel. Den är inte ett alternativ till, eller en ersättning för, de befintliga testmetoderna B.31, B.34, B.35 eller B.56.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

5. Denna screeningtestmetod kan användas för att få en första information om vilka eventuella effekter en kemikalie har på reproduktion och/eller utveckling, antingen på ett tidigt stadium genom bedömning av kemikalies toxikologiska egenskaper eller genom bedömning av kemikalien i sig. Studien kan också användas som en del av flera screeningtest för att ge en första bedömning av befintliga kemikalier för vilka ingen eller begränsad toxikologisk information finns tillgänglig, eller som en preliminär undersökning inför mer omfattande studier om reproduktion/utveckling eller när det av andra skäl anses

relevant. Vid genomförande av studien bör man följa de vägledande principer och överväganden som beskrivs i OECD:s vägledning nr 19 om erkännande, bedömning och användning av kliniska tecken som humana endpoints för försöksdjur som används för säkerhetsbedömningar (5).

6. Denna testmetod ger ingen komplett information om alla aspekter av reproduktion och utveckling. Den är särskilt begränsad när det gäller att detektera postnatala uttryck av prenatal exponering, eller effekter som kan orsakas av postnatal exponering. Bland annat på grund av det ringa antalet försöksdjur i doseringsgrupperna, selektiviteten hos endpoints samt studiens begränsade varaktighet ger denna metod inga bevis för definitiva påståenden om utebliven effekt. Vid avsaknad av data från andra toxicitetstest om reproduktion/utveckling kan de positiva resultaten dessutom användas för en inledande riskbedömning och bidra till beslutsfattande gällande vilka övriga test som behövs och när.
7. Resultaten som erhöles genom de endokrinrelaterade parametrarna bör betraktas mot bakgrund av OECD:s begreppsram för provning och bedömning av hormonstörande ämnen (6). Den vidareutvecklade OECD TG 421 ingår i nivå 4 av begreppsramen som ett in vivo-test som genererar data om skadliga effekter för endokrinrelaterade endpoints. En endokrin signal kanske dock inte räcker för att påvisa att testkemikalien är ett hormonstörande ämne.
8. Vid test enligt denna metod används oral tillförsel av testkemikalien. Om tillförsel sker på annat sätt kan metoden behöva modifieras.
9. Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag.
10. De definitioner som används finns i tillägg 1.

TESTPRINCIP

11. Testkemikalien tillförs i graderade doser till flera grupper av hanar och honor. Hanarna ska behandlas i minst fyra veckor, inbegripet dagen före den planerade avlivningen (detta inkluderar minst två veckor före parning, under parningsperioden och ungefär två veckor efter parning). Eftersom hanarna endast behandlas under en begränsad period före parning utgör fertilitet ingen särskilt känslig indikator för testikeltoxicitet. Därför krävs en detaljerad histologisk undersökning av testiklarna. En två veckors doseringsperiod före parning i kombination med efterföljande observationer av parning/fertilitet och en sammanlagd doseringsperiod på minst fyra veckor, följt av en ingående histopatologisk analys av hanarnas könskörtlar, anses vara tillräckligt för att påvisa flertalet effekter på hanarnas fertilitet och spermatogenes.
12. Honorna bör behandlas under hela studien. Detta inbegriper två veckor före parning (i syfte att täcka minst två kompletta ägglossningscykler), tiden fram till befruktning,

dräktighetsperioden samt minst tretton dagar efter födsel, fram till planerad dag för avlivning.

13. Studiens längd, efter acklimatisering och bedömning av ägglossningscykeln före behandling, beror på honornas kondition och ligger på runt 63 dagar (minst 14 dagar före parning, (upp till) 14 dagars parning, 22 dagars dräktighetsperiod samt 13 dagars laktation).
14. Under administreringsperioden observeras djuren varje dag noggrant för tecken på toxicitet. Djur som dör eller avlivas under testet obduceras, och i slutet av testet avlivas överlevande djur och obduceras.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Val av djurart

15. Denna testmetod är avsedd att användas på råtta. En utförlig motivering ska ges om de parametrar som anges i denna testmetod undersöks hos en annan art av gnagare. I det internationella valideringsprogrammet för att påvisa hormonstörande ämnen i OECD TG 407 (motsvaras av kapitel B.7 i denna bilaga) var råtta den enda art som användes. Stammar med låg fertilitet eller välkänd hög incidens av utvecklingsdefekter ska inte användas. Friska tidigare obefruktade djur, som inte tidigare har använts i försök, ska användas. Försöksdjuren ska karakteriseras efter art, stam, kön, vikt och ålder. Vid testets början bör variationen i vikt mellan djuren vara minimal och får inte överstiga 20 % av vardera könets medelvikt. 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

16. Alla förfaranden bör överensstämma med lokala normer för laboratoriedjurvård. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 °C ($\pm$ 3°). 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 ljusperioden 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodring kan konventionellt laboratoriefoder användas med obegränsad tillgång till dricksvatten. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie när den administreras genom denna metod.
17. Djuren bör inhysas i små grupper med individer av samma kön. Djuren kan inhysas individuellt om det är vetenskapligt motiverat. Vid grupplacering i bur bör inte fler än fem djur inhysas per bur. För parningsprocedurerna används burar som är lämpliga för ändamålet. Dräktiga honor ska hysas individuellt och förses med bomaterial. Digivande honor ska hysas individuellt med sina ungar.

18. Fodret bör regelbundet analyseras beträffande främmande ämnen. Ett prov av fodret bör sparas tills rapporten är slutförd.

Förberedelse av djuren

19. Friska yngre adulta djur fördelas slumpmässigt till kontroll- och behandlingsgrupperna. Burarna bör placeras i sådan ordning att eventuella verkningar på grund av placeringen minimeras. Djuren ska ha en unik identifiering och hållas i sina burar under minst fem dagar innan undersökningen börjar, för att göra det möjligt för dem att acklimatiseras till förhållandena i laboratoriet.

Beredning av doser

20. Rekommendationen är att testkemikalien administreras oralt såvida inga andra tillförselsätt anses mer lämpliga. Vid oral administrering ges testkemikalien i regel via sond, men testkemikalien kan även ges via fodret eller dricksvattnet.
21. 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/emulsion i olja (t.ex. majsolja) och därefter eventuell lösning i andra vehiklar. För andra vehiklar än vatten bör vehikelns toxiska egenskaper vara kända. Testkemikaliens stabilitet och homogenitet i vehikeln bör bestämmas.

FÖRFARANDE

Djurens antal och kön

22. Det rekommenderas att varje grupp inledningsvis innehåller minst 10 hanar och 12–13 honor. Honornas ägglossningscykler undersöks före exponeringen, och individer som inte uppvisar typiska cykler på 4–5 dagar ska inte tas med i studien. Det är därför extra honor rekommenderas initialt så att varje grupp innehåller 10 honor. Förutom vid betydande toxiska effekter förväntas detta leda till minst 8 dräktiga honor per grupp, vilket i regel utgör det minsta acceptabla antalet dräktiga honor per grupp. Syftet med detta är att säkerställa ett tillräckligt antal dräktighetsperioder och ungar för att säkerställa en meningsfull utvärdering av hur testkemikalien kan påverka fertilitet, dräktighet och moderskaps- och digivningsbeteende samt tillväxt och utveckling i F₁-avkomman från befruktning till dag 13 post partum.

Dosering

23. I allmänhet bör minst tre doseringsgrupper och en kontrollgrupp användas. Dosnivåerna kan baseras på information från akuta toxicitetstester eller på resultat från studier med upprepad dosering. 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.

24. Dosnivåerna bör väljas med hänsyn till eventuell toxicitetsdata och (toxikologisk) kinetisk data som finns tillgänglig. Hänsyn bör tas till eventuell skillnad i sensitivitet mellan dräktiga och icke-dräktiga djur. 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 doseringsnivåerna, och att lägga till en fjärde testgrupp är att föredra framför att använda mycket stora intervall (t.ex. mer än faktor 10) mellan doseringarna.
25. Vid observation av tecken på allmän toxicitet (t.ex. minskad kroppsvikt, effekter på lever, hjärta, lungor eller njurar) eller andra förändringar som kanske inte är toxiska reaktioner (t.ex. nedsatt födointag, leverförstoring) ska observerade effekter avseende endokrint känsliga endpoints tolkas med försiktighet.

Toleranstest

26. Om ett försök med en doseringsnivå om minst 1 000 mg per kg kroppsvikt och dag eller, vid tillförsel i föda eller dricksvatten, en motsvarande andel i födan eller dricksvattnet och med användning av det tillvägagångssätt som beskrivits för denna studie, inte ger några observerbara toxiska effekter och om toxicitet inte förväntas på grundval av uppgifter från strukturellt närbesläktade ämnen, kan en fullständig undersökning med tre dosnivåer anses överflödigt. Detta toleranstest är tillämpligt förutom i fall där sannolik exponering på människor indikerar att en högre oral doseringsnivå behövs. För andra former av tillförsel, såsom inandning eller applicering på huden, kan testkemikaliens fysikalkemiska egenskaper ofta utnyttjas för att indikera och begränsa den maximala exponeringsnivån.

Administrering av doser

27. Försöksdjuren behandlas med testkemikalien dagligen under en vecka. När testkemikalien tillförs genom sondmatning bör detta ske i en engångsdos via magsond eller lämplig intubationskanyl. Den maximala vätskevolymen som kan administreras vid ett tillfälle är beroende av försöksdjurets storlek. Volymen får inte överstiga 1 ml per 100 g kroppsvikt, utom för vattenlösningar där volymen kan uppgå till 2 ml per 100 g kroppsvikt. Med undantag för irriterande eller korrosiva testkemikalier, 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.
28. För kemikalier som tillförs via fodret eller dricksvattnet 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 doseringsnivå i förhållande till djurens kroppsvikt användas. Det alternativ som används ska anges. En testkemikalie som tillförs

genom sondmatning bör ges vid samma tid varje dag och justeras minst varje vecka så att dosnivån hålls konstant i förhållande till djurens kroppsvikt.

Försöksschema

29. Behandlingen av båda könen bör påbörjas minst två veckor före parning, efter att de har aklimatiserats under minst fem dagar och efter att honorna har screenats för normala ägglossningscykler (under en tvåveckorsperiod före behandlingen). Studien bör planläggas så att bedömningen av ägglossningscykeln påbörjas kort efter att djuret ifråga blivit könsmogt. Detta kan variera något mellan olika råtstammar i olika laboratorier, t.ex. 10 veckors ålder för Sprague Dawley-råttor och 12 veckors ålder för Wistar-råttor. Moderdjur med ungar bör avlivas på dag 13 post partum, eller kort därefter. Dagen för födseln (dvs. efter avslutad förlossning) definieras som dag 0 post partum. Honor som inte uppvisar några tecken på att ha parat sig ska avlivas 24–26 dagar efter parningsperiodens sista dag. Tillförseln fortsätts för båda könen under den två veckor långa parningsperioden. Hanar ska ges fortsatt behandling efter parningsperioden och minst till dess att en minimidoseringsperiod på totalt 28 dagar har uppnåtts. Därefter avlivas de eller hålls kvar och ges fortsatt behandling för en andra parning om så bedöms lämpligt.
30. Daglig dosering till dräktiga honor och moderdjur ska fortsätta genom hela dräktighetsperioden och minst till och med dag 13 post partum eller till dagen före avlivningsdagen. När testkemikalien tillförs via inhalation eller applicering på huden ska doseringen fortsätta minst till och med dräktighetsdag 19, och doseringen bör återupptas så fort som möjligt efter födsel och inte senare än PND 4.
31. Ett diagram för försöksschemat finns i tillägg 2.

Parningsprocedur

32. I regel ska 1:1-parningar (en hane per hona) användas i denna studie. Undantagssituationer kan uppstå om hanar dör. Honan ska inhysas med samma hane tills parning bevisligen har skett eller två veckor har förflutit. Honorna ska undersökas varje morgon för närvaron av sperma eller vaginalproppar. Dag 0 av dräktigheten definieras som den dag då bevis på parning bekräftas (fynd av vaginalpropp eller sperma). Om parningen inte lyckas kan man överväga ett nytt parningsförsök där honor sammanförs med hanar med fastställd fertilitet från samma grupp.

Kullstorlek

33. På dag 4 efter födseln kan storleken på varje kull justeras genom att eliminera extra ungar genom slumpmässigt urval, så att det blir, så nära som möjligt, fyra eller fem ungar per kön per kull, beroende på den normala kullstorleken i den råtstam som använts. Blodprover ska tas på två av överskottsungarna och sparas för bestämning av T4-nivåer i serum. Selektiv eliminering av ungar, t.ex. utifrån kroppsvikt eller anogenitalt avstånd (AGD), är inte lämpligt. När antalet han- eller honungar inte medger fyra eller fem av varje kön per kull, är partiell anpassning acceptabelt (t.ex. sex hanar och fyra honor). Inga ungar ska

elimineras när kullstorleken är mindre än det avsedda målet (8 eller 10 ungar/kull). Om det endast finns en överskottsunge utöver det avsedda målet ska endast en unge elimineras och användas för blodinsamling och eventuell bedömning av T4 i serum.

34. Om kullstorleken inte korrigeras ska två ungar per kull avlivas på dag 4 efter födseln och blodprov tas för att mäta koncentrationen av tyreoidhormoner i serum. Om det är möjligt ska dessa två ungar per kull vara honungar, så att hanungar kan reserveras för senare bedömning av bröstvärteretention, förutom då eliminering av dessa honungar innebär att det inte finns några honor kvar för den slutliga bedömningen. Inga ungar ska elimineras när kullstorleken är mindre än 8 eller 10 ungar/kull (beroende på den normala kullstorleken för den rättstam som använts). Om det endast finns en unge mer än normalt antal ungar per kull ska endast en unge elimineras och användas för blodinsamling och eventuell bedömning av T4 i serum.

Observationer av levande djur

Kliniska observationer

35. Allmänna kliniska observationer bör göras minst en gång per dag under hela testperioden, och oftare när tecken på toxicitet observeras. Observationerna bör företrädesvis utföras vid samma tidpunkt varje dag och med hänsyn till förväntade toppeffekter efter doseringen. Relevanta beteendeförändringar, tecken på svårartad eller förlängd födsel och alla toxicitetstecken, inbegripet dödlighet, ska registreras. Dessa rapporter ska inkludera information om toxicitetstecknens början, grad och varaktighet.

Kroppsvikt samt foder- och vattenkonsumtion

36. Hanar och honor ska vägas på doseringens första dag, minst en gång i veckan därefter samt vid testets slut. Under dräktighetstiden ska honorna vägas på dag 0, 7, 14 och 20 samt inom 24 timmar efter födseln (dag 0 eller 1 post partum) och åtminstone på dag 4 och 13 post partum. Dessa observationer bör rapporteras individuellt för varje vuxet djur.
37. Under tiden före parning, dräktighetsperiod samt laktation ska foderintaget mätas åtminstone en gång i veckan. Det är inte obligatoriskt att mäta foderintaget under parningsperioden. Om testkemikalien tillförs via dricksvattnet bör även vattenkonsumtionen mätas under nämnda perioder.

Ägglossningscykler

38. Ägglossningscyklerna bör övervakas innan behandlingen startar i syfte att välja ut honor med regelbundna cykler till försöket (se punkt 22). Även vaginala utstryk bör övervakas från behandlingens början till dess att parning bevisligen har genomförts. Om det vid doseringens början föreligger misstankar om akuta stresseffekter som kan störa ägglossningscyklerna kan laboratoriet exponera försöksdjuren under två veckor och därefter samla in vaginala utstryk dagligen i syfte att övervaka ägglossningscyklerna under minst två veckor före parning, med fortsatt övervakning under parningsperioden fram till dess att parning bevisligen skett. När celler från vagina eller livmoderhals samlas in bör

försiktighet iakttas för att undvika skador på slemhinnan, eftersom sådana kan framkalla pseudodräktighet (7) (8).

Parametrar för avkomman

39. Dräktighetsperioden bör registreras och beräknas från dräktighetsdag 0. Varje kull ska undersökas snarast möjligt efter nedkomsten i syfte att fastställa antal och kön för ungar, dödfödda, levande födda, småväxta ungar (avsevärt mindre än motsvarande kontrollungar) samt eventuella större avvikelser.
40. Levande ungar ska räknas och könsbestämmas, och kullarna ska vägas inom 24 timmar efter födseln (dag 0 eller 1 post partum) samt åtminstone på dag 4 och 13 post partum. Utöver de observationer som beskrivs i punkt 35 ska allt onormalt beteende hos ungarna registreras.
41. AGD på varje unge ska mätas på samma dag efter födseln, någon gång mellan PND 0 och PND 4. Ungarnas kroppsvikt bör samlas in under dagen för AGD-mätningen, och AGD bör normaliseras till ett mått på ungarnas storlek, företrädesvis kubikroten ur kroppsvikten (9). Antal bröstvårtor/vårtgårdar på hanungarna ska räknas på PND 12 eller 13 enligt rekommendationerna i OECD GD 151 (10).

Klinisk biokemi

42. Blodprov tas från ett definierat ställe utifrån följande schema:

- från minst två ungar per kull på dag 4 efter födseln, om antalet ungar så tillåter (se punkterna 33 och 34),
- från alla moderdjur och minst två ungar per kull när försöket avslutas på dag 13, och
- från alla vuxna hanar vid försökets slut.

Alla blodprov ska förvaras under lämpliga förhållanden. Blodproverna som tas på 13 dagar gamla ungar samt vuxna hanar ska analyseras för tyreoidhormoner (T4) i serum. Ytterligare analys av T4 i blodproven från moderdjuren och de 4 dagar gamla ungarna görs om det bedöms relevant. Om det är relevant kan blodet även analyseras för andra hormoner. Ungarnas blod kan samförvaras per kull för analys av tyreoidhormoner. Thyreoidhormonerna (T4 och TSH) bör helst mätas som ett totalvärde.

43. 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.

44. Plasmaprover särskilt avsedda för hormonbestämning bör tas vid en jämförbar tid på dagen. De numeriska värden som erhålls vid analys av hormonkoncentrationer skiljer sig åt mellan de olika analyssatser som finns i handeln.

Patologi

Obduktion

45. Vid avlivning eller om djur dör under pågående test ska vuxna djur undersökas makroskopiskt med avseende på avvikelser eller patologiska förändringar. Särskild uppmärksamhet bör ägnas åt organen i reproduktionssystemet. Antal implantationsställen ska registreras. Vaginala utstryk ska undersökas på morgonen samma dag som obduktionen äger rum för att fastställa ägglossningscykelns skede och möjliggöra korrelation med äggstockarnas histopatologi.
46. På samtliga hanar ska all angränsande vävnad putsas bort från testiklar och bitestiklar liksom från prostata och sädesblåsor med koaguleringskörtlar varefter våtvikten mäts snarast möjligt efter dissektion innan organen hinner torka. Utöver detta kan fler organ vägas, som till exempel muskelkomplexen levator ani och bulbocavernosus, Cowpers körtlar eller ollonet hos hanar samt äggstockspar (våtvikt) och livmoder (inklusive livmoderhals) hos honor. Om dessa organ vägs ska deras vikt registreras snarast möjligt efter dissektion.
47. Döda ungar och ungar som avlivas på dag 13 post partum, eller kort därefter, ska undersökas noga åtminstone externt för grova avvikelser. Särskild uppmärksamhet bör fästas vid de yttre reproduktionsorganen, som ska undersökas för tecken på avvikande utveckling. På dag 13 ska sköldkörteln från 1 hanunge och 1 honunge per kull bevaras.
48. Äggstockar, testiklar, accessoriska könsorgan (livmoder och livmoderhals, bitestiklar, sädesblåsor plus koaguleringskörtlar) och sköldkörtlar från samtliga vuxna försöksdjur, inklusive alla organ som uppvisar skador vid makroskopisk undersökning, ska bevaras. Fixering med formalin rekommenderas inte för rutinundersökning av testiklar och bitestiklar. I stället bör Bouins lösning eller modifierat fixeringsmedel enligt Davidson användas för dessa vävnader (11). Tunica albuginea kan punkteras försiktigt och ytligt med en nål på organets båda poler för en snabb inträngning av fixeringsmedlet.

Histopatologi

49. En detaljerad histologisk undersökning ska genomföras på äggstockar, testiklar och bitestiklar (särskild uppmärksamhet bör fästas vid spermatogenesens stadier samt vid histopatologin hos den interstitiella cellstrukturen i testiklarna) på försöksdjuren i den högsta doseringsgruppen samt på djuren i kontrollgruppen. Övriga organ som bevarats inklusive sköldkörtlar från ungar och vuxna djur kan undersökas om det behövs. Sköldkörtelns vikt kan bestämmas efter fixering. Putsning ska också göras väldigt försiktigt, och först efter fixeringen för att undvika vävnadsskador. Vävnadsskador kan påverka den histopatologiska analysen negativt. När förändringar observeras i gruppen med högst

dosering kan undersökningen utökas till att inkludera djur från andra doseringsgrupper. Vägledningen om histopatologi (11) omfattar detaljerad information om dissektion, fixering, sektionering och histopatologi av endokrina vävnader.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

50. Data bör rapporteras individuellt per djur. Alla data ska sammanställas i en tabell. Tabellen ska för varje testgrupp visa antalet djur vid testets början, antalet djur som under testets gång har dött eller avlivats av humana skäl, tidpunkten för alla dödsfall eller humana avlivningar, antalet fertila djur, antalet dräktiga honor, antalet djur som uppvisar tecken på toxicitet, en beskrivning av de toxicitetstecken som har observerats (inklusive tidpunkt då dessa först upptäcktes samt verkningarnas varaktighet och allvarlighetsgrad), typerna av histopatologiska förändringar samt all annan relevant data om kullarna. I tillägg 3 finns ett tabellformat som har visat sig vara mycket användbart för att redovisa reproduktiva effekter och utvecklingseffekter.
51. På grund av denna studies begränsade omfattning har statistiska analyser om ”signifikans” begränsat värde för flera endpoints, särskilt reproduktiva sådana. Om statistiska analyser används ska en lämplig metod för distributionen av den valda variabeln väljas ut innan testet påbörjas. Statistiska analyser av AGD och bröstvärteretention ska baseras på data för varje individuell unge med beaktande av effekter på kullen ifråga. När så är lämpligt ska kullen utgöra analysenheten. Statistiska analyser av ungarnas kroppsvikt ska baseras på data för varje individuell unge med beaktande av kullstorlek. På grund av den ringa gruppstorleken kan det också vara värdefullt att använda historiska kontrolldata (t.ex. för kullstorlek), om sådana finns, som ett stöd för tolkning av studien.

Utvärdering av resultaten

52. Resultaten bör utvärderas i termer av de observerade effekterna, inklusive obduktion och mikroskopiska iakttagelser. Utvärderingen ska omfatta förhållandet mellan testkemikaliedosen och närvaron eller frånvaron av samt incidensen och allvarlighetsgraden av avvikelser, inbegripet grova skador, identifierade målorgan, infertilitet, kliniska avvikelser, verkningar på reproduktionsförmågan och kullen, avvikelser rörande kroppsvikt, verkningar på mortaliteten samt alla andra toxiska effekter.
53. Eftersom hanarna endast behandlas under en kort tid bör histopatologin hos testiklar och bitestiklar bedömas tillsammans med fertilitetsdata vid uppskattningen av effekter på reproduktionsförmågan hos hanar. Historiska kontrolldata om reproduktion/utveckling (t.ex. kullstorlek, AGD, bröstvärteretention, T4-nivåer i serum), om sådana finns, kan vara användbara vid tolkningen av studien.
54. Som kvalitetskontroll föreslås att historiska kontrolldata samlas in och att man för numeriska data beräknar variationskoefficienter, särskilt för de parametrar som kopplas till

påvisande av hormonstörande ämnen. Dessa data kan sedan användas för jämförelseändamål när aktuella studier utvärderas.

Testrapport

55. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

- Källa, satsnummer, sista förbrukningsdag om detta anges.
- Testkemikaliens stabilitet, om den är känd.

Monokomponentämne:

- fysikaliskt tillstånd, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,
- kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.

Multikomponentämne, UVCB-ämnen och blandningar:

- karakteriseras så långt som möjligt genom kemisk beteckning (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.

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, foder osv.
- Djurens individuella vikt vid testets början.
- Motivering för val av art, om inte råtta.

Testbetingelser:

- Grund för valet av dosnivå.
- Uppgifter om testkemikaliens 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.
- Detaljerad beskrivning av slumpmässighetsförfaranden för att välja ut ungar för avlivning, om avlivning skett.

Resultat:

- Kroppsvikt/kroppsviktsförändringar.
- Foderkonsumtion och vattenkonsumtion, i förekommande fall.
- Uppgifter om toxisk reaktion uppdelade efter kön och dos, inbegripet fertilitet, dräktighet och avkommans livsduglighet.
- Dräktighetsperiodens längd.
- Toxiska eller andra verkningar på reproduktion, avkomma, postnatal tillväxt och dylikt.
- Art, allvarlighetsgrad och varaktighet för kliniska observationer (huruvida de är reversibla eller ej).
- Antal vuxna honor med normal eller onormal ägglossningscykel samt cykelns varaktighet.
- Antalet levande födda och postimplantationsförlust.
- Uppgifter om ungarnas kroppsvikt.
- AGD på samtliga ungar (och deras kroppsvikt på dagen för mätning av AGD).
- Bröstvärteretention hos hanungar.
- Nivåer av tyreoidhormoner hos 13 dagar gamla ungar och vuxna hanar (samt på moderdjur och 4 dagar gamla ungar om detta har uppmätts).
- Antal ungar med lätt synliga avvikelser, generell bedömning av yttre könsorgan och antal småväxta ungar.
- Tidpunkt för dödsfall under testet eller huruvida djuren överlevde fram till avslutningen.
- Antal implantationer, kullstorlek och kullens vikt vid tiden för registrering.
- Kroppsvikt vid avlivningen samt absolut och relativ organvikt för föräldradjuret.
- Obduktionsfynd.
- En detaljerad redogörelse av alla histopatologiska fynd.
- Absorptionsdata (om sådana är kända).
- Statistisk bearbetning av resultaten, i tillämpliga fall.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

Tolkning av resultaten

56. Denna studie bedömer toxicitetsverkningar på reproduktion/utveckling vid administrering av upprepade doser (se punkterna 5 och 6). Studien kan ge en indikation om behovet av vidare undersökningar och vägledning för hur uppföljande studier bör utformas. OECD:s vägledningsdokument 43 bör konsulteras som stöd vid tolkningen av reproduktions- och utvecklingsresultaten (12). OECD:s vägledningsdokument 106 om histologisk bedömning av endokrina och reproduktiva tester på gnagare (11) ger information om beredning och bedömning av (endokrina) organ och vaginala utstryk som kan vara användbar för denna testmetod.

LITTERATURHÄNVISNINGAR

- (1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Tillgängligt på förfrågan hos Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27–29 oktober, 1992. Tillgängligt på förfrågan hos Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Tillgängligt på förfrågan hos Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 217, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment nr 19, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (6) OECD (2011). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 150, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.
- (8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, i Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.
- (9) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

- (10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 151, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 106, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 43, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

Tillägg 1

DEFINITIONER (SE ÄVEN OECD GD 150 (6))

Androgenicitet är förmågan hos en kemikalie att fungera som ett naturligt androgent hormon (t.ex. testosteron) hos ett däggdjur.

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

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

Antityreoid aktivitet är förmågan hos en kemikalie att undertrycka verkan av ett naturligt tyreoidhormon (t.ex. T₃) hos ett däggdjur.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Utvecklingstoxicitet: uttryck för reproduktionstoxicitet i form av pre-, peri- eller postnatale strukturella eller funktionella störningar i avkomman.

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

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

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.

Nedsatt fertilitet innebär störningar i fortplantningsförmågan hos hanen eller honan.

Maternell toxicitet: skadliga effekter på dräktiga honor som kan ske antingen specifikt (direkt effekt) eller icke-specifikt (indirekt effekt).

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 östrogen hormon (t.ex. 17 β -östradiol) hos ett däggdjur.

Reproduktionstoxicitet innebär skadliga effekter på avkomman och/eller en försämring av fortplantningsförmågan hos hanar och honor.

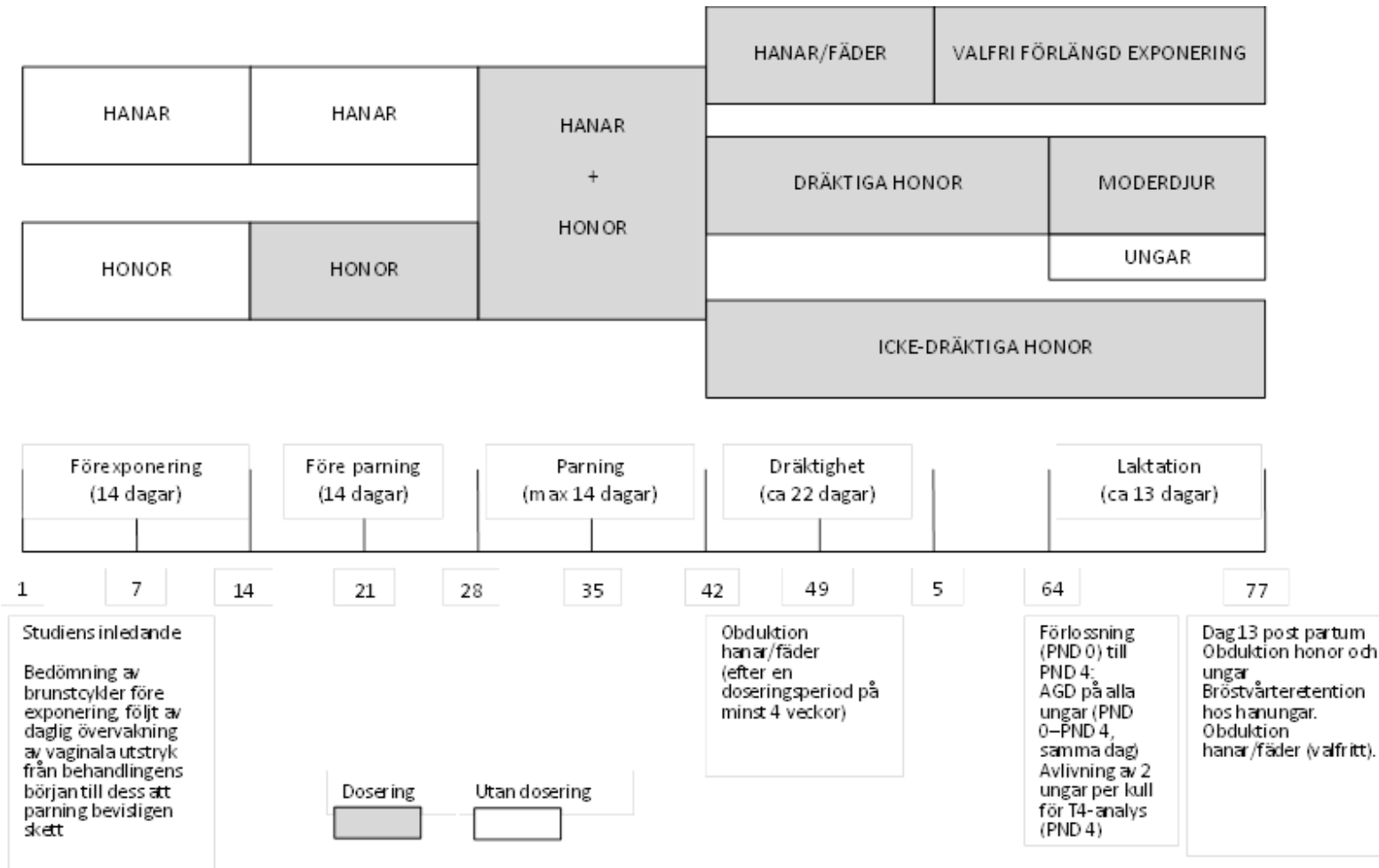
Testkemikalie: varje ämne eller blandning som testas med denna testmetod.

Tyreoid aktivitet är förmågan hos en kemikalie att agera som ett naturligt tyreoidhormon (t.ex. T₃) hos ett däggdjur.

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

FÖRSÖKSSCHEMA SOM VISAR STUDIENS MAXIMALA VARAKTIGHET, BASERAT PÅ EN 14-DAGARS PARNINGSPERIOD



Tillägg 3

SAMMANFATTNING I TABELLFORM AV EFFEKTER PÅ REPRODUKTION/UTVECKLING

IAKTTAGELSER	VÄRDEN				
Dosering (enheter)	0 (kontroll)	.. .	.. .	.. .	.. .
Startade par (N)					
Ägglossningscykel (för oregelbundna cykler åtminstone medellängd och frekvens)					
Honor som bevisligen befruktats (N)					
Honor som blivit dräktiga (N)					
Befruktningsdag 1–5 (N)					
Befruktningsdag 6–. . . ⁽¹⁾ (N)					
Dräktighetsperiod ≤ 21 dagar (N)					
Dräktighetsperiod = 22 dagar (N)					
Dräktighetsperiod ≥ 23 dagar (N)					
Moderdjur med levande ungar (N)					
Moderdjur med levande ungar på dag 4 post partum (N)					
Implantationer/moderdjur (medel)					
Levande ungar/moderdjur vid födseln (medel)					
Levande ungar/moderdjur på dag 4 (medel)					
Könsfördelning (m/f) vid födseln (medel)					
Könsfördelning (m/f) på dag 4 (medel)					
Kullens vikt vid födseln (medel)					
Kullens vikt på dag 4 (medel)					

⁽¹⁾ Parningsperiodens sista dag

Ungarnas vikt vid födseln (medel)					
Ungarnas vikt vid AGD-mätningen (medel – hanungar, medel – honungar)					
Ungarnas AGD på samma dag efter födseln, från födseln – dag 4 (medel – hanungar, medel – honungar)					
Ungarnas vikt på dag 4 (medel)					
Bröstvärteretention hos hanungarna på dag 13 (medel)					
Ungarnas vikt på dag 13 (medel)					
ONORMALA UNGAR					
Moderdjur med 0					
Moderdjur med 1					
Moderdjur med ≥ 2					
FÖRLORAD AVKOMMA					
Prenatal/post-implantationer (implantationer minus levande födda)					
Honor med 0					
Honor med 1					
Honor med 2					
Honor med ≥ 3					
Postnatal (levande födda minus levande ungar på dag 13)					
Honor med 0					
Honor med 1					
Honor med 2					
Honor med ≥ 3					

B.64 TOXICITETSSTUDIE MED UPPREPADE DOSER KOMBINERAD MED SCREENINGTEST FÖR REPRODUKTIONS-/UTVECKLINGSTOXICITET

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 422 (2016). OECD:s riktlinjer för kemikalietestning utvärderas med jämna mellanrum för att anpassas till den vetenskapliga utvecklingen. De ursprungliga riktlinjerna för screeningtest 422 antogs 1996 utifrån ett protokoll för upprepad dosering kombinerat med reproduktions-/utvecklingstoxicitet som diskuterats vid två expertmöten, i London 1990 (1) och i Tokyo 1992 (2).
2. I denna testmetod kombineras dels en screeningdel för reproduktions-/utvecklingstoxicitet som bygger på erfarenheter från medlemsländer som använt sig av den ursprungliga metoden på befintliga högvolykmekikalier och som gjort explorativa tester med positiva kontrollämnen (3) (4), dels en del som avser toxicitet vid upprepad dosering, i enlighet med OECD:s testriktlinje 407 (28-dagars toxicitetsstudie med upprepad oral dosering på gnagare, som motsvaras av kapitel B.7 i denna bilaga).
3. Denna testmetod har uppdaterats med endpoints som är relevanta för hormonstörande ämnen, och detta är en uppföljning till den högprioriterade verksamhet som OECD inledde 1998 för att revidera befintliga testriktlinjer och ta fram nya riktlinjer för screening och testning av potentiella hormonstörande ämnen (5). Inom ramen för denna verksamhet utökades TG 407 (motsvaras av kapitel B.7 i denna bilaga) 2008 med parametrar för att påvisa endokrin aktivitet hos testkemikalier. Syftet med uppdateringen av TG 422 var att inkludera några endpoints som är relevanta för hormonstörande ämnen i riktlinjerna för screeningtester där exponeringsperioderna omfattar några av de känsliga utvecklingsperioderna (pre- eller tidiga postnatalperioder).
4. De nya utvalda endpoints som är relevanta för hormonstörande ämnen och som också ingår i TG 443 (utökad enkelgenerationsstudie av reproduktionstoxicitet, motsvarande kapitel B.56 i denna bilaga) inkluderades i TG 422 på grundval av en förstudie som behandlade vetenskapliga och tekniska aspekter av deras inkludering samt nödvändiga anpassningar av testets utformning för att möjliggöra ett inkluderande (6).
5. Denna testmetod är utformad för att generera begränsad information om en testkemikalies effekter på den hanliga och honliga fortplantningsförmågan, t.ex. beträffande könskörtlarnas funktion, parningsbeteende, befruktning, embryoutveckling och födsel. Den är inte ett alternativ till, eller en ersättning för, de befintliga testmetoderna B.31, B.34, B.35 eller B.56.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

6. Vid bedömningen och utvärderingen av de toxiska egenskaperna hos en testkemikalie kan bestämningen av toxicitet med upprepad oral dosering genomföras efter att inledande

information om toxicitet har erhållits genom testning av akut toxicitet. Denna studie ger information om eventuella troliga hälsorisker vid upprepad exponering under en relativt begränsad tidsperiod. 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. Vid genomförandet av studien bör man alltid följa de vägledande principer och överväganden som beskrivs i OECD:s vägledningsdokument 19 om erkännande, bedömning och användning av kliniska tecken som humana endpoints för försöksdjur som används för säkerhetsbedömningar (7).

7. Metoden består dessutom av ett screeningtest för reproduktions-/utvecklingstoxicitet och kan därför även användas för att ge preliminär information om möjliga effekter på fortplantningsförmågan hos hanar och honor, t.ex. beträffande könskörtlarnas funktion, parningsbeteende, befruktning, embryoutveckling och förlossning, antingen för en tidig bedömning av testkemikaliers toxikologiska egenskaper eller för bedömning av farliga testkemikalier. Denna testmetod ger ingen komplett information om alla aspekter av reproduktion och utveckling. Metoden ger endast begränsad möjlighet att detektera postnatale uttryck på prenatal exponering, eller effekter som kan ha orsakats av postnatal exponering. Bland annat på grund av selektiviteten hos endpoints samt studiens begränsade varaktighet ger denna metod inga bevis eller definitiva svar om utebliven effekt på reproduktion/utveckling. Vid avsaknad av data från andra toxicitetstest om reproduktion/utveckling kan de positiva resultaten dessutom användas för en inledande riskbedömning och bidra till beslutsfattande gällande vilka övriga test som behövs och när.
8. Resultaten som erhöles genom de endokrinrelaterade parametrarna bör betraktas mot bakgrund av OECD:s begreppsram för provning och bedömning av hormonstörande ämnen (8). Den vidareutvecklade OECD TG 422 ingår i nivå 4 av begreppsramen som ett in vivo-test som genererar data om skadliga effekter för endokrinrelaterade endpoints. En endokrin signal kanske dock inte räcker för att påvisa att testkemikalien är ett hormonstörande ämne.
9. Denna metod lägger även vikt vid neurologiska effekter som en särskild endpoint samt behovet av noggranna kliniska observationer av djuren för att erhålla mesta möjliga information. Metoden ska identifiera kemikalier med eventuell neurotoxisk verkan, vilket kan motivera mer ingående undersökningar av den aspekten. Denna metod kan dessutom ge basindikationer på immunologiska effekter.
10. Med tanke på avsaknaden av data från andra systemtest om reproduktions-/utvecklingstoxicitet, neurotoxicitet och/eller immuntoxicitet kan de positiva resultaten användas för en inledande riskbedömning och bidra till beslutsfattande gällande vilka övriga test som behövs och när. Detta test är särskilt användbart som en del av SIDS (OECD Screening Information Data Set) för att bedöma befintliga kemikalier som det finns ringa eller ingen toxikologisk information om, och det kan användas som ett alternativ till genomförande av två separata test: ett för toxicitet vid upprepad dosering (OCD TG 407, motsvaras av kapitel B.7 i denna bilaga) respektive ett för reproduktions-

/utvecklingstoxicitet (OECD TG 421, motsvaras av kapitel B.63 i denna bilaga). Det kan även användas som en preliminär undersökning inför mer omfattande studier om reproduktion/utveckling, eller av andra anledningar.

11. Den allmänna uppfattningen är att det finns skillnader i sensitivitet mellan dräktiga och icke-dräktiga djur. I kombinerade tester kan det därför vara mer komplicerat att fastställa dosnivåer som är korrekta för bedömning av både generell systemtoxicitet och specifik reproduktions-/utvecklingstoxicitet än vad det är i individuella test som utförs separat. Det kan därför vara svårare att tolka testresultaten vad gäller allmän systemtoxicitet än vid genomförande av separata studier med upprepade doser, särskilt när parametrarna för serum och histopatologi inte bedöms samtidigt i studien. På grund av denna tekniska komplexitet krävs det stor erfarenhet av toxicitetstest för att utföra detta kombinerade screeningtest. Å andra sidan kan ett kombinerat test, förutom att det endast kräver ett litet antal försöksdjur, erbjuda bättre möjligheter att skilja direkta effekter på reproduktion/utveckling från sådana som sekundära (systemiska).
12. I det här testet är doseringsperioden längre än i en konventionell 28-dagars studie med upprepade doser. Det kräver dock färre djur av varje kön per grupp jämfört med när en konventionell 28-dagars studie med upprepade doser genomförs som ett komplement till ett screeningtest för reproduktions-/utvecklingstoxicitet.
13. Vid test enligt denna metod används oral tillförsel av testkemikalien. Om tillförsel sker på annat sätt kan metoden behöva modifieras.
14. Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag.
15. De definitioner som används finns i tillägg 1.

TESTPRINCIP

16. Testkemikalien tillförs i graderade doser till flera grupper av hanar och honor. Hanarna ska behandlas i minst fyra veckor, inbegripet dagen före den planerade avlivningen (detta inkluderar minst två veckor före parning, under parningsperioden och ungefär två veckor efter parning). Eftersom hanarna endast behandlas under en begränsad period före parning kan fertilitet inte anses utgöra en särskilt känslig indikator för testikeltoxicitet. Därför krävs en detaljerad histologisk undersökning av testiklarna. En två veckors doseringsperiod före parning i kombination med efterföljande observationer av parning/fertilitet och en sammanlagd doseringsperiod på minst fyra veckor, följt av en ingående histopatologisk analys av hanarnas könskörtlar, anses vara tillräckligt för att påvisa flertalet effekter på hanarnas fertilitet och spermatogenes.

17. Honorna bör behandlas under hela studien. Detta inbegriper två veckor före parning (i syfte att täcka minst två kompletta ägglossningscykler), tiden fram till befruktning, dräktighetsperioden samt minst tretton dagar efter födsel, fram till planerad dag för avlivning.
18. Studiens längd, efter acklimatisering och bedömning av ägglossningscykeln före behandling, beror på honornas kondition och ligger på runt 63 dagar (minst 14 dagar före parning, (upp till) 14 dagars parning, 22 dagars dräktighetsperiod samt 13 dagars laktation).
19. 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.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Val av djurart

20. Denna testmetod är avsedd att användas på råttor. Om de parametrar som anges i denna TG 422 undersöks hos en annan gnagarart ska detta motiveras utförligt. I det internationella valideringsprogrammet för att påvisa hormonstörande ämnen i TG 407 var råttor den enda art som användes. Stammar med låg fertilitet eller välkänd hög incidens av utvecklingsdefekter ska inte användas. Friska tidigare obefruktade djur, som inte tidigare har använts i försök, ska användas. Försöksdjuren ska karakteriseras efter art, stam, kön, vikt och ålder. Vid testets början bör variationen i vikt mellan de använda djuren vara minimal och får inte överstiga $\pm 20\%$ av vardera könets medelvikt. 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

21. Alla förfaranden bör överensstämma med lokala normer för laboratoriedjurvård. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3^{\circ}$). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30% och helst inte överstiga 70% , utom när rummet rengörs. Belysningen bör vara artificiell med ljusperioden 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodring kan konventionellt laboratoriefoder användas med obegränsad tillgång till dricksvatten. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie när den administreras genom denna metod.
22. Djuren bör inhysas i små grupper med individer av samma kön. Djuren kan inhysas individuellt om det är vetenskapligt motiverat. Vid grupplacering i bur bör inte fler än fem djur inhysas i en och samma bur. För parningsprocedurerna används burar som är lämpliga för ändamålet. Dräktiga honor ska hysas individuellt och förses med bomaterial. Digivande honor ska hysas individuellt med sina ungar.

23. Fodret bör regelbundet analyseras beträffande främmande ämnen. Ett prov av fodret bör sparas tills rapporten är slutförd.

Förberedelse av djuren

24. Friska yngre adulta djur fördelas slumpmässigt till behandlingsgrupper och burar. Burarna bör arrangeras på ett sådant sätt att eventuella effekter på grund av burarnas placering minimeras. Djuren ska ha en unik identifiering och hållas i sina burar under minst fem dagar innan undersökningen börjar, för att göra det möjligt för dem att acklimatiseras till förhållandena i laboratoriet.

Beredning av doser

25. Det rekommenderas att testkemikalien administreras oralt såvida inte andra tillförselsätt anses mer lämpliga. Vid oral administrering ges testkemikalien i regel via sond, men testkemikalien kan även ges via fodret eller via dricksvattnet.
26. Vid behov kan testkemikalien upplösas eller suspenderas i en lämplig vehikel. Det rekommenderas att man, när så är möjligt, i första hand använder en vattenbaserad lösning/suspension, i andra hand en lösning/suspension i olja (t.ex. majsolja) och i tredje hand en lösning i andra vehiklar. För andra vehiklar än vatten bör vehikelns toxiska egenskaper vara kända. Testkemikaliens stabilitet och homogenitet i vehikeln bör bestämmas.

FÖRFARANDE

Djurens antal och kön

27. Det rekommenderas att varje grupp inledningsvis innehåller minst 10 hanar och 12–13 honor. Honornas ägglossningscykler undersöks före exponeringen, och de honor som inte uppvisar typiska cykler på 4–5 dagar ska inte tas med i studien. Det är därför extra honor rekommenderas initialt så att varje grupp innehåller 10 honor. Förutom vid betydande toxiska effekter förväntas detta leda till minst 8 dräktiga honor per grupp, vilket i regel utgör det minsta acceptabla antalet dräktiga honor per grupp. Syftet med detta är att säkerställa ett tillräckligt antal dräktighetsperioder och ungar för att säkerställa en meningsfull utvärdering av testkemikaliens potential att påverka fertilitet, dräktighet och moderskaps- och digivningsbeteende samt tillväxt och utveckling i F₁-avkomman från befruktning till dag 13 post partum. Om avlivningar är inplanerade under testets gång bör antalet djur ökas med det antal djur som enligt planeringen ska avlivas innan testet avslutas. En extra satellitgrupp på fem djur per kön i kontroll- respektive toppdosgruppen bör övervägas för observation beträffande reversibilitet, persistens eller fördröjda toxiska verkningar under minst 14 dagar efter behandlingen. Djuren i satellitgrupperna ska inte paras och används därför inte för bedömning av reproduktions-/utvecklingstoxicitet.

Dosering

28. I allmänhet bör minst tre doseringsgrupper och en kontrollgrupp användas. Om det inte finns några lämpliga data tillgängliga kan en preliminär undersökning (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.
29. Dosnivåerna bör väljas med hänsyn till eventuell toxicitetsdata och (toxikologisk) kinetisk data som finns tillgänglig. Hänsyn bör tas till eventuell skillnad i sensitivitet mellan dräktiga och icke-dräktiga djur. Den högsta doseringsnivån bör väljas i syfte att den ska inducera toxiska verkningar, men inte leda till döden eller orsaka uppenbart lidande. Därefter bör en fallande nivå på doserna väljas i syfte att påvisa eventuella dosrelaterade responser och frånvaro av skadliga effekter vid den lägsta dosnivån. Det är ofta optimalt med två till fyra intervall, och tillägg av en fjärde testgrupp är ofta att föredra framför användning av mycket breda intervall (exempelvis mer än faktorn 10) mellan doseringsnivåerna.
30. Vid observation av tecken på allmän toxicitet (t.ex. minskad kroppsvikt, effekter på lever, hjärta, lungor eller njurar) eller andra förändringar som kanske inte är toxiska reaktioner (t.ex. nedsatt födointag, leverförstoring) ska observerade effekter avseende endokrint känsliga endpoints tolkas med försiktighet.

Toleranstest

31. Om ett försök med en doseringsnivå om minst 1 000 mg per kg kroppsvikt och dag eller, vid tillförsel i föda eller dricksvatten, en motsvarande andel i födan eller dricksvattnet (baserad på fastställd kroppsvikt) och med användning av det tillvägagångssätt som beskrivits för denna studie, inte ger några observerbara toxiska effekter och om toxicitet inte förväntas på grundval av uppgifter från strukturellt närbesläktade ämnen, kan en fullständig undersökning med flera dosnivåer anses överflödigt. Toleranstestet ska tillämpas utom när mänsklig exponering anger att en högre doseringsnivå ska användas. När testkemikalien tillförs på annat sätt, t.ex. via inandning eller applicering på huden, kan dess fysikalisk-kemiska egenskaper ofta användas för att fastställa den maximala exponeringsnivå som går att uppnå.

Administrering av doser

32. Försöksdjuren behandlas med testkemikalien dagligen under en vecka. När testkemikalien tillförs genom sondmatning bör detta ske i en engångsdos via magsond eller lämplig intubationskanyl. Den maximala vätskevolymen som kan administreras vid ett tillfälle är beroende av försöksdjurets storlek. Volymen får inte överstiga 1 ml per 100 g kroppsvikt, utom för vattenlösningar där volymen kan uppgå till 2 ml per 100 g kroppsvikt. Med undantag för irriterande eller korrosiva testkemikalier, 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.

33. För kemikalier som tillförs via fodret eller dricksvattnet är det viktigt att säkerställa att kvantiteterna av testkemikalien ifråga inte påverkar normal närings- eller vattenbalans. När testkemikalien tillförs via kosten kan antingen en konstant foderkoncentration (PPM) eller en konstant doseringsnivå i förhållande till djurens kroppsvikt användas. Det alternativ som används ska anges. En testkemikalie som tillförs genom sondmatning bör ges vid samma tid varje dag och justeras minst varje vecka så att dosnivån hålls konstant i förhållande till djurens kroppsvikt. Om en kombinerad studie används för att förbereda en långtidsstudie eller en fullständig studie avseende reproduktionstoxicitet bör liknande foder användas i båda testerna.

Försöksschema

34. Behandlingen av båda könen bör påbörjas två veckor före parning, efter att de har acklimatiserats under minst fem dagar och efter att honorna har screenats för normala ägglossningscykler (under en tvåveckorsperiod före behandlingen). Studien bör planläggas så att bedömningen av ägglossningscykeln påbörjas kort efter att djuret ifråga blivit könsmoget. Detta kan variera något mellan olika råtstammar i olika laboratorier, t.ex. 10 veckors ålder för Sprague Dawley-råttor och 12 veckors ålder för Wistar-råttor. Moderdjur med ungar bör avlivas på dag 13 post partum, eller kort därefter. Moderdjur och ungar behöver inte nödvändigtvis avlivas på samma dag, om detta omöjliggör för moderdjuret att fasta dagen före blodprovstagningen (om fastande är att föredra). Dagen för födseln (dvs. efter avslutad förlossning) definieras som dag 0 post partum. Honor som inte uppvisar några tecken på att ha parat sig ska avlivas 24–26 dagar efter parningsperiodens sista dag. Tillförseln fortsätts för båda könen under den två veckor långa parningsperioden. Hanarna ska ges fortsatt behandling efter parningsperioden och minst till dess att en minimidoseringsperiod på 28 dagar har uppnåtts. Därefter avlivas de eller hålls kvar och ges fortsatt behandling för en andra parning om så bedöms lämpligt.
35. Daglig dosering till dräktiga honor och moderdjur ska fortsätta genom hela dräktighetsperioden och minst till och med dag 13 post partum eller dagen före avlivningsdagen. När testkemikalien tillförs via inhalation eller applicering på huden ska doseringen fortsätta minst till och med dräktighetsdag 19, och doseringen bör återupptas så fort som möjligt efter födseln och inte senare än PND 4.
36. Djur i satellitgrupper för vilka uppföljande observationer planeras, om sådana är inkluderade i testet, ska inte paras. Dessa djur bör hållas i minst ytterligare 14 dagar utan behandling för att fördröjda eller kvarstående effekter eller återhämtning från toxiska effekter ska kunna upptäckas.
37. Ett diagram för försöksschemat finns i tillägg 2.

Ägglossningscykler

38. Ägglossningscyklerna bör övervakas innan behandlingen startar i syfte att välja ut honor med regelbundna cykler till försöket se punkt 27). Även vaginala utstryk bör övervakas dagligen från behandlingens början till dess att parning bevisligen skett. Om det vid doseringens början föreligger misstankar om akuta stresseffekter som kan störa ägglossningscyklerna kan laboratoriet exponera försöksdjuren under två veckor och därefter samla in vaginala utstryk dagligen i syfte att övervaka ägglossningscyklerna under minst två veckor före parning, med fortsatt övervakning under parningsperioden fram till dess att parning bevisligen skett. När celler från vagina eller livmoderhals samlas in bör försiktighet iaktas för att undvika skador på slemhinnan, eftersom sådana kan framkalla pseudodräktighet (8) (9).

Parningsprocedur

39. I regel ska 1:1-parningar (en hane per hona) användas i denna studie. Undantagssituationer kan uppstå om hanar dör. Honan ska inhysas med samma hane tills parning bevisligen har skett eller två veckor har förflutit. Honorna ska undersökas varje morgon för närvaron av sperma eller vaginalproppar. Dag 0 av dräktigheten definieras som den dag då bevis på parning bekräftas (fynd av vaginalpropp eller sperma). Om parningen inte lyckas kan man överväga ett nytt parningsförsök där honor sammanförs med hanar med fastställd fertilitet från samma grupp.

Kullstorlek

40. På dag 4 efter födseln kan storleken på varje kull justeras genom att eliminera extra ungar genom slumpmässigt urval, så att det blir, så nära som möjligt, fyra eller fem ungar per kön per kull, beroende på den normala kullstorleken i den rättstam som använts. Blodprov ska tas från två av överskottsungarna och sedan slås ihop och användas för bestämning av T4-nivåer i serum. Selektiv eliminering av ungar, t.ex. utifrån kroppsvikt eller anogenitalt avstånd (AGD), är inte lämpligt. När antalet han- eller honungar inte medger fyra eller fem av varje kön per kull, är partiell anpassning acceptabelt (t.ex. sex hanar och fyra honor). Inga ungar ska elimineras när kullstorleken är mindre än det avsedda målet (8 eller 10 ungar/kull). Om det endast finns en överskottsunge utöver det avsedda målet ska endast en unge elimineras och användas för blodinsamling och eventuell bedömning av T4 i serum.
41. Om kullstorleken inte korrigeras ska två ungar per kull avlivas på dag 4 efter födseln och blodprov tas för att mäta koncentrationen av tyreoidhormoner i serum. Om det är möjligt ska dessa två ungar per kull vara honungar, så att hanungar kan reserveras för senare bedömning av bröstvärteretention, förutom då eliminering av dessa honungar innebär att det inte finns några honor kvar för den slutliga bedömningen. Inga ungar ska elimineras när kullstorleken är mindre än 8 eller 10 ungar/kull (beroende på den normala kullstorleken för den rättstam som använts). Om det endast finns en unge mer än normalt antal ungar per kull ska endast en unge elimineras och användas för blodinsamling och eventuell bedömning av T4 i serum.

Observationer

42. Allmänna kliniska observationer bör göras minst en gång per dag, helst vid samma tidpunkt varje dag med hänsyn till maximalt förväntade effekter efter doseringen. Djurens hälsotillstånd bör registreras. Minst två gånger dagligen bör alla djur observeras beträffande morbiditet och mortalitet.
43. 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 föräldradjur. Dessa observationer bör göras utanför buren på en "standardarena" och helst vid samma tidpunkt varje gång. Observationerna ska registreras noggrant, helst med hjälp av ett poängsystem som definierats utförligt av testlaboratoriet. Åtgärder bör vidtas för att säkerställa att variationen i testbetingelser är minimal och att observationerna helst utförs av personer 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, piloerektion, pupillstorlek, ovanligt andningsmönster). Förändringar i gång, hållning och reaktion på hantering liksom eventuella kramper eller spasmer, stereotypier (t.ex. överdrivet putsande, repetitivt cirklande), svåra eller förlängda förlossningar eller bisarrt beteende (t.ex. självstympning, baklängesgång) ska också registreras (10).
44. Vid ett tillfälle under studiens gång ska en bedömning göras av djurens sinnesreaktioner på olika sorters stimuli (t.ex. auditiva, visuella och proprioceptiva stimuli) (8) (9) (11), samt av djurens gripstyrka (12) och motorisk aktivitet (13), och för denna bedömning ska fem hanar och fem honor väljas ut slumpmässigt ur varje grupp. Ytterligare uppgifter om de procedurer som kan följas finns i respektive hänvisningar. Dock kan även andra procedurer än de som hänvisas till användas. När det gäller hanarna ska nämnda funktionsobservationer göras mot slutet av doseringsperioden, kort före planerad avlivning men före hematologisk eller klinisk blodprovstagning (se punkterna 53–56 inklusive fotnot 1). Honorna bör befinna sig i ett liknande fysiologiskt tillstånd vid tidpunkten för dessa funktionstester, vilka företrädesvis ska utföras en gång under den sista laktationsveckan (t.ex. LD 6–13), kort före planerad avlivning. Eventuell separation av moderdjur och deras ungar ska minimeras så långt det är möjligt.
45. Funktionsobservationer som görs en gång mot slutet av studien kan utelämnas om studien utförs som inledning till en subkronisk (90-dagars) eller en långtidsstudie. I så fall bör funktionsobservationerna i stället tas med i nämnda uppföljningsstudie. Å andra sidan kan tillgången på data om funktionsobservationer från studien med upprepad dosering öka möjligheten att välja dosnivåer för en efterföljande subkronisk studie eller långtidsstudie.
46. I undantagsfall kan funktionsobservationer utelämnas för grupper som annars skulle uppvisa tecken på toxicitet i sådan utsträckning att det väsentligen skulle påverka funktionstestets prestanda.
47. Dräktighetsperioden bör registreras och beräknas från dräktighetsdag 0. Varje kull ska undersökas snarast möjligt efter nedkomsten i syfte att fastställa antal och kön för ungar,

dödfödda, levande födda, småväxta djur (ungar som är avsevärt mindre än motsvarande kontrollungar) samt eventuella större avvikelser.

48. Levande ungar ska räknas och könsbestämmas, och kullarna ska vägas inom 24 timmar efter födseln (dag 0 eller dag 1 post partum) samt åtminstone på dag 4 och 13 post partum. Utöver observationerna av föräldradjuren (se punkterna 43 och 44) ska allt onormalt beteende hos ungarna registreras.
49. AGD på varje unge ska mätas på samma dag efter födseln, någon gång mellan PND 0 och PND 4. Ungarnas kroppsvikt bör samlas in under dagen för AGD-mätningen, och AGD bör normaliseras till ett mått på ungarnas storlek, företrädesvis kubikroten ur kroppsvikten (14). Antal bröstvårtor/vårtgårdar på hanungarna ska räknas på PND 12 eller 13 enligt rekommendationerna i OECD GD 151 (15).

Kroppsvikt och foder-/vattenkonsumtion

50. Hanar och honor ska vägas på behandlingens första dag, minst en gång i veckan därefter samt vid testets slut. Under dräktighetstiden ska honorna vägas på dag 0, 7, 14 och 20 samt inom 24 timmar efter födseln (dag 0 eller 1 post partum) och åtminstone på dag 4 och 13 post partum. Dessa observationer bör rapporteras individuellt för varje vuxet djur.
51. Under tiden före parning, dräktighetsperiod samt laktation ska foderintaget mätas åtminstone en gång i veckan. Det är inte obligatoriskt att mäta foderintaget under parningsperioden. Om testkemikalien tillförs via dricksvattnet bör även vattenkonsumtionen mätas under nämnda perioder.

Hematologi

52. Vid ett tillfälle under studiens gång ska följande hematologiska undersökningar göras på fem hanar och fem honor som väljs ut slumpmässigt ur varje grupp: hematokrit, hemoglobinkoncentrationer, räkning av röda blodkroppar, retikulocyter, total- och differentialräkning av vita blodkroppar, blodplättsräkning samt ett mått på koaguleringshastighet och koaguleringsförmåga. Andra bestämningar som bör utföras, om testkemikalien eller dess förmodade metaboliter har eller misstänks ha oxiderande egenskaper, inkluderar methemoglobinkoncentration och Heinz-kroppar.
53. Blodproven ska tas från ett angivet ställe. Honorna bör befinna sig i ett liknande fysiologiskt tillstånd under provtagningen. För att undvika praktiska problem relaterade till skillnad i dräktighetslängd kan blodprovstagningen utföras i slutet av perioden före parning i stället för strax innan, eller i samband med, avlivningen av djuren. Blodproven på hanarna ska helst tas strax innan, eller i samband med, avlivningen av djuren. Blodproven på hanarna kan också tas i slutet av perioden före parning om denna tidpunkt har föredragits för honorna.
54. Alla blodprov ska förvaras under lämpliga förhållanden.

Klinisk biokemi

55. En klinisk biokemisk bedömning i syfte att undersöka större toxikologiska effekter på vävnaderna, och i synnerhet på njurar och lever, bör utföras på de blodprover som samlats in från de fem hanar och fem honor som valts ut från varje grupp. Det rekommenderas att djuren fastar natten före blodprovstagningen.¹ Undersökningar av plasma eller serum bör omfatta natrium, kalium, glukos, totalkolesterol, urinämne, kreatinin, totalprotein och albumin, minst två enzymer som indikerar effekter på leverceller (t.ex. alaninaminotransferas, aspartataminotransferas och sorbitoldehydrogenas) samt gallsyror. Mätningar av ytterligare enzymer (från lever eller annat ursprung) och bilirubin kan under vissa omständigheter ge användbar information.

56. Blodprov tas från ett definierat ställe utifrån följande schema:

- från minst två ungar per kull på dag 4 efter födseln, om antalet ungar så tillåter (se punkterna 40 och 41),
- från alla moderdjur och minst två ungar per kull när försöket avslutas på dag 13, och
- från alla vuxna hanar, vid försökets slut.

Alla blodprov ska förvaras under lämpliga förhållanden. Blodproverna som tas på 13 dagar gamla ungar samt vuxna hanar ska analyseras för tyreoidhormoner (T4) i serum. Ytterligare analys av T4 i blodproven från moderdjuren och de 4 dagar gamla ungarna görs om det bedöms relevant. Om det är relevant kan blodet även analyseras för andra hormoner. Ungarnas blod kan samförvaras per kull för analyser av tyreoidhormoner. Thyroidhormonerna (T4 och TSH) bör helst mätas som ett totalvärde.

57. Följande urinanalyser kan utföras på fem slumpmässigt utvalda hanar från varje grupp under studiens sista vecka med hjälp av schemalagd urininsamling: utseende, volym, osmolalitet eller specifik vikt, pH, protein, glukos och blod/blodceller.

58. Dessutom bör undersökning av serummarkörer av allmänna vävnadsskador övervägas. Andra bestämningar som bör utföras om testkemikalien kända egenskaper kan, eller

¹ För en rad olika mätningar i serum och plasma, särskilt för glukos, är nattlig fasta att föredra. 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. Å andra sidan kan dock den nattliga fastan inkräkta på (de dräktiga) djurens allmänna metabolism och störa laktation och digivningsbeteende, och de kan även, särskilt under foderstudier, störa den dagliga exponeringen för testkemikalien. Om nattlig fasta används ska kliniska biokemiska bestämningar utföras efter utförandet av funktionsobservationer under vecka 4 i studien, för hanarnas del. Moderdjuren bör hållas i ytterligare en dag efter att ungarna tagits bort, på t.ex. PND 13). Moderdjuren ska fasta över natten mellan laktationsdag 13 och 14, och terminalt blod användas för kliniska kemiska parametrar.

misstänks, påverka relaterade metaboliska profiler omfattar kalcium, fosfat, fastevärden av triglycerider och glukos samt specifika hormoner, methemoglobin och kolinesteras. Detta behöver undersökas från fall till fall.

59. 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.

60. Plasmaprover särskilt avsedda för hormonbestämning bör tas vid en jämförbar tid på dagen. De numeriska värden som erhöles vid analys av hormonkoncentrationer skiljer sig åt mellan de olika analyssatser som finns i handeln.

61. 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. För honorna ska data samlas in från digivande djur.

PATOLOGI

Obduktion

62. Alla vuxna djur i undersökningen bör underkastas en fullständig detaljerad obduktion som omfattar en noggrann yttre granskning av kroppen och alla kroppsöppningar liksom av kranium och bröst- och bukhåla samt deras innehåll. Särskild uppmärksamhet bör ägnas åt organen i reproduktionssystemet. Antal implantationsställen ska registreras. Vaginala utstryk ska undersökas på dagen för obduktionen för att fastställa stadium i ägglossningscykeln och möjliggöra korrelation med histopatologin hos honornas fortplantningsorgan.

63. På samtliga hanar ska all angränsande vävnad putsas bort från testiklar och bitestiklar liksom från prostata och sädesblåsor med koaguleringskörtlar, varefter våtvikten mäts snarast möjligt efter dissektion innan organen hinner torka. Utöver detta kan fler organ vägas, som till exempel muskelkomplexen levator ani och bulbocavernosus, Cowpers körtlar eller ollonet hos hanar samt äggstockspar (våtvikt) och livmoder (inklusive livmoderhals) hos honor. Om dessa organ vägs ska deras vikt registreras snarast möjligt efter dissektion. Äggstockar, testiklar, bitestiklar, accessoriska könsorgan samt alla organ som uppvisar skador vid makroskopisk undersökning ska sparas från samtliga vuxna försöksdjur.

64. Sköldkörtlar ska sparas från alla vuxna hanar och honor samt från två 13 dagar gamla ungar från varje kull (en hane och en hona) och förvaras i det fixativ som bedöms

lämpligast för en senare histopatologisk undersökning. Sköldkörtelnas vikt kan bestämmas efter fixering. Putsning ska också göras väldigt försiktigt, och först efter fixeringen för att undvika vävnadsskador. Vävnadsskador kan äventyra den histopatologiska analysen. Blodprover bör tas från ett angivet ställe strax före eller i samband med avlivningen av djuren, och förvaras under lämpliga förhållanden (se punkt 56).

65. För minst fem vuxna hanar och honor som valts ut slumpmässigt från varje grupp (utom sådana som påträffats döende och/eller avlivats före försökets slut) ska all angränsande vävnad putsas bort från lever, njurar, binjurar, bräss, mjälte, hjärna och hjärta, beroende på vad som gäller, och organens våtvikt ska mätas snarast möjligt efter dissektion innan de hinner torka. Följande vävnader och organ bör bevaras i det mest lämpade fixeringsmediet med hänsyn till både typen av vävnad och planerade efterföljande histopatologiska undersökningar: alla större skador, hjärna (representativa områden inklusive cerebrum, cerebellum och pons), ryggmärg, ögon, mage, tunn- och tjocktarm (inklusive Peyers plack), lever, njurar, binjurar, mjälte, hjärta, bräss, luftstrupe och lungor (konserverade genom uppumpning med fixeringsmedel följt av nedsänkning), könskörtlar (testiklar och äggstockar), accessoriska könsorgan (livmoder och livmoderhals, bitestiklar, prostata, sädesblåsor plus koaguleringskörtlar), vagina, urinblåsa, lymfkörtlar (utöver den mest proximala dräneringsnoden bör en annan lymfnod tas i enlighet med laboratoriets erfarenheter (16)), 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 lösning eller modifierat fixeringsmedel enligt Davidson (16) (17) (18). Fixering med formalin rekommenderas inte för dessa vävnader. Tunica albuginea kan punkteras försiktigt och ytligt med en nål på organets båda poler för en snabb inträngning av fixeringsmedlet. Kliniska och andra fynd kan indikera behovet av att undersöka ytterligare vävnader. Även samtliga organ som sannolikt är målorgan, baserat på kunskap om testkemikaliens egenskaper, ska konserveras.
66. Följande vävnader kan ge värdefulla tecken på endokrinrelaterade effekter: könskörtlar (äggstockar och testiklar), accessoriska könsorgan (livmoder inklusive livmoderhals, bitestiklar, sädesblåsor med koaguleringskörtlar, dorsolaterala och ventrala prostata), vagina, hypofys, hanliga bröstkörtlar och binjurar). Förändringar i hanliga 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 punkt 65 är valfria.
67. Döda ungar och ungar som avlivas på dag 13 post partum, eller kort därefter, ska undersökas noga åtminstone externt för grova avvikelser. Särskild uppmärksamhet bör fästas vid de yttre reproduktionsorganen, som ska undersökas för tecken på avvikande utveckling.

Histopatologi

68. En fullständig histopatologisk analys bör utföras på bevarade organ och vävnader från de utvalda djuren i kontroll- och högdosgrupperna (med särskild tonvikt på spermatogenesens stadier i de hanliga könskörtlarna och histopatologin hos den interstitiella cellstrukturen i testiklarna). Sköldkörtlar från ungar och resterande vuxna djur kan undersökas vid behov. Dessa undersökningar bör utsträckas till djur i alla andra doseringsgrupper, om behandlingsrelaterade förändringar observeras i högdosgruppen. Vägledningen om histopatologi (10) omfattar detaljerad information om dissektion, fixering, sektionering och histopatologi av endokrina vävnader.
69. Alla stora skador bör undersökas. Målorgan från övriga dosgrupper bör undersökas som ett led i NOAEL-klarläggningsprocessen, och särskilt organ från grupper som påstås uppvisa NOAEL.
70. 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

71. Data bör rapporteras individuellt per djur. Därutöver bör alla data sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antal djur vid testets början, antal djur som hittats döda under testet eller som avlivats av humanitära skäl och tidpunkten för dödsfallen eller avlivningen, antal fertila djur, antal dräktiga honor, antal djur som visar tecken på toxicitet, en beskrivning av de tecken på toxicitet som observerats, inklusive tidpunkt för de första tecknen och deras varaktighet och allvarlighetsgrad, typ av histopatologiska förändringar, samt alla relevanta data om kullarna. I tillägg 3 finns ett tabellformat som har visat sig vara mycket användbart för bedömning av reproduktions- och utvecklingseffekter.
72. 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. Statistiska analyser av AGD och bröstvårteretention ska baseras på data för varje individuell unge med beaktande av effekter på kullen ifråga. När så är lämpligt ska kullen utgöra analysenheten. Statistiska analyser av ungarnas kroppsvikt ska baseras på data för varje individuell unge med beaktande av kullstorlek. På grund av denna studies begränsade omfattning har statistiska analyser om ”signifikans” begränsat värde för flera endpoints, särskilt reproduktiva sådana. Några av de vanligaste metoderna, särskilt parametriska tester för mätning av centrala tendenser, är olämpliga. Om statistiska analyser används ska en lämplig metod för distributionen av den valda variabeln väljas ut innan testet påbörjas.

Utvärdering av resultaten

73. Resultaten bör utvärderas i termer av de observerade effekterna, inklusive obduktion och mikroskopiska iakttagelser. Utvärderingen ska omfatta förhållandet mellan

testkemikaliedosen och närvaron eller frånvaron av samt incidensen och allvarlighetsgraden av avvikelser, inbegripet grova skador, identifierade målorgan, infertilitet, kliniska avvikelser, verkningar på reproduktionsförmågan och kullen, avvikelser rörande kroppsvikt, verkningar på mortaliteten samt alla andra toxiska effekter.

74. Eftersom hanarna endast behandlas under en kort tid bör histopatologin hos testiklar och bitestiklar bedömas tillsammans med fertilitetsdata vid uppskattningen av effekter på hanarnas fortplantningsförmåga. Historiska kontrolldata om reproduktion/utveckling (t.ex. kullstorlek, AGD, bröstvärteretention, T4-nivåer i serum), om sådana finns, kan också vara användbara vid tolkningen av studien.
75. Som kvalitetskontroll föreslås att historiska kontrolldata samlas in och att man för numeriska data beräknar variationskoefficienter, särskilt för de parametrar som kopplas till påvisande av hormonstörande ämnen. Dessa data kan sedan användas för jämförelseändamål när aktuella studier utvärderas.

Testrapport

76. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

- Källa, satsnummer, sista förbrukningsdag om detta anges.
- Testkemikalies stabilitet, om den är känd.

Monokomponentämne:

- fysikaliskt tillstånd, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,
- kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.

Multikomponentämne, UVCB-ämnena och blandningar:

- karakteriseras så långt som möjligt genom kemisk beteckning (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.

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, foder osv.
- Djurens individuella vikt vid testets början.
- Motivering för val av art, om inte råtta.

Testbetingelser:

- Grund för valet av dosnivå.
- Uppgifter om testkemikaliens sammansättning/foderberedning, uppnådd koncentration, beredningens 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.
- Detaljerad beskrivning av slumpmässighetsförfaranden för att välja ut ungar för avlivning, om avlivning skett.

Resultat:

- Kroppsvikt/kroppsviktsförändringar.
- Foder- och vattenkonsumtion, i förekommande fall.
- Uppgifter om toxiska reaktioner uppdelade efter kön och dos, inbegripet fertilitet, dräktighet och andra tecken på
- toxicitet.
- Dräktighetsperiodens längd.
- Toxiska eller andra verkningar på reproduktion, avkomma, postnatal tillväxt etc.
- Art, allvarlighetsgrad och varaktighet för kliniska observationer (vare sig de är reversibla eller ej).
- Bedömningar av sensorisk aktivitet, gripstyrka och motorisk aktivitet.
- Hematologiska tester med relevanta basvärden.
- Kliniska biokemiska tester med relevanta basvärden.
- Antal vuxna honor med normal eller onormal ägglossningscykel samt cykelns varaktighet.
- Antalet levande födda samt antalet förluster efter implantation.
- Antal ungar med grova synliga avvikelser. En generell bedömning av yttre könsorgan, antalet småväxta ungar.

- Tidpunkt för dödsfall under testet eller huruvida djuren överlevde fram till avslutningen.
- Antal implantationer, kullstorlek och kullens vikt vid tiden för registrering.
- Uppgifter om ungarnas kroppsvikt.
- AGD på samtliga ungar (och deras kroppsvikt på dagen för mätning av AGD).
- Bröstvärteretention hos hanungar.
- Nivåer av tyreoidahormoner hos 13 dagar gamla ungar och vuxna hanar (samt på moderdjur och 4 dagar gamla ungar om detta har uppmätts).
- Kroppsvikt vid avlivningen samt absolut och relativ organvikt för föräldradjuret.
- Obduktionsfynd.
- En detaljerad redogörelse för alla histopatologiska fynd.
- Absorptionsdata (om sådana är kända).
- Statistisk bearbetning av resultaten, i tillämpliga fall.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

Tolkning av resultaten

77. Denna studie bedömer reproduktions-/utvecklingstoxicitet vid administrering av upprepade doser. Eftersom vikten läggs på endpoints för både allmän toxicitet och reproduktions-/utvecklingstoxicitet, kommer resultaten från studien att göra det möjligt att skilja mellan sådana reproduktions-/utvecklingseffekter som förekommer i frånvaron av allmän toxicitet och sådana som bara uttrycks på nivåer som också är giftiga för föräldradjuret (se punkterna 7–11). Studien kan ge en indikation om behovet av vidare undersökningar och vägledning för hur uppföljande studier bör utformas. OECD:s vägledningsdokument 43 bör konsulteras som stöd vid tolkningen av reproduktions- och utvecklingsresultaten (19). OECD:s vägledningsdokument 106 om histologisk bedömning av endokrina och reproduktiva tester på gnagare (16) ger information om beredning och bedömning av (endokrina) organ och vaginala utstryk som kan vara användbar för denna testmetod.

LITTERATURHÄNVISNINGAR

- (1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Tillgängligt på förfrågan hos Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris
- (2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. . Tillgängligt på förfrågan hos Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris
- (3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. och Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). *J. Toxicol Sci.*, 19, s. 141–149.
- (4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. och Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. *Fundam. Appl. Toxicol.*, kap. 18, s. 89–95.
- (5) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, den 10–11 mars 1998, tillgänglig på förfrågan hos Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 217, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. och Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

- (9) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, i Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
- (10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document nr 60.
- (11) Moser V.C., McDaniel K.M. and Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, s. 267–283.
- (12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. och Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, s. 233–236.
- (13) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, s. 599–609.
- (14) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp och V.L. Reynolds. (1999). "Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights", *Reproductive Toxicology*, 13: s. 383–390.
- (15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment nr 151. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (16) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, nr 106, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (17) Hess RA och 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.
- (18) 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, s. 524–533.
- (19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environmental Health and Safety Publications,

Series on Testing and Assessment nr 43, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

- (20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, nr 150, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

Tillägg 1

DEFINITIONER (SE ÄVEN (20) OECD GD 150)

Androgenicitet är förmågan hos en kemikalie att fungera som ett naturligt androgent hormon (t.ex. testosteron) hos ett däggdjur.

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

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

Antityreoid aktivitet är förmågan hos en kemikalie att undertrycka verkan av ett naturligt tyreoidhormon (t.ex. T₃) hos ett däggdjur.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Utvecklingstoxicitet: uttryck för reproduktionstoxicitet i form av pre-, peri- eller postnatale strukturella eller funktionella störningar i avkomman.

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

Dosering är en allmän term som omfattar dosen, dess frekvens samt doseringens varaktighet.

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.

Nedsatt fertilitet innebär störningar i fortplantningsförmågan hos hanen eller honan.

Maternell toxicitet: skadliga effekter på dräktiga honor som kan ske antingen specifikt (direkt effekt) eller icke-specifikt (indirekt effekt) och som är relaterade till det dräktiga tillståndet.

NOAEL är förkortningen för den nivå 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 östrogen hormon (t.ex. 17 β -östradiol) hos ett däggdjur.

Reproduktionstoxicitet innebär skadliga effekter på avkomman och/eller en försämring av fortplantningsförmågan hos hanar och honor.

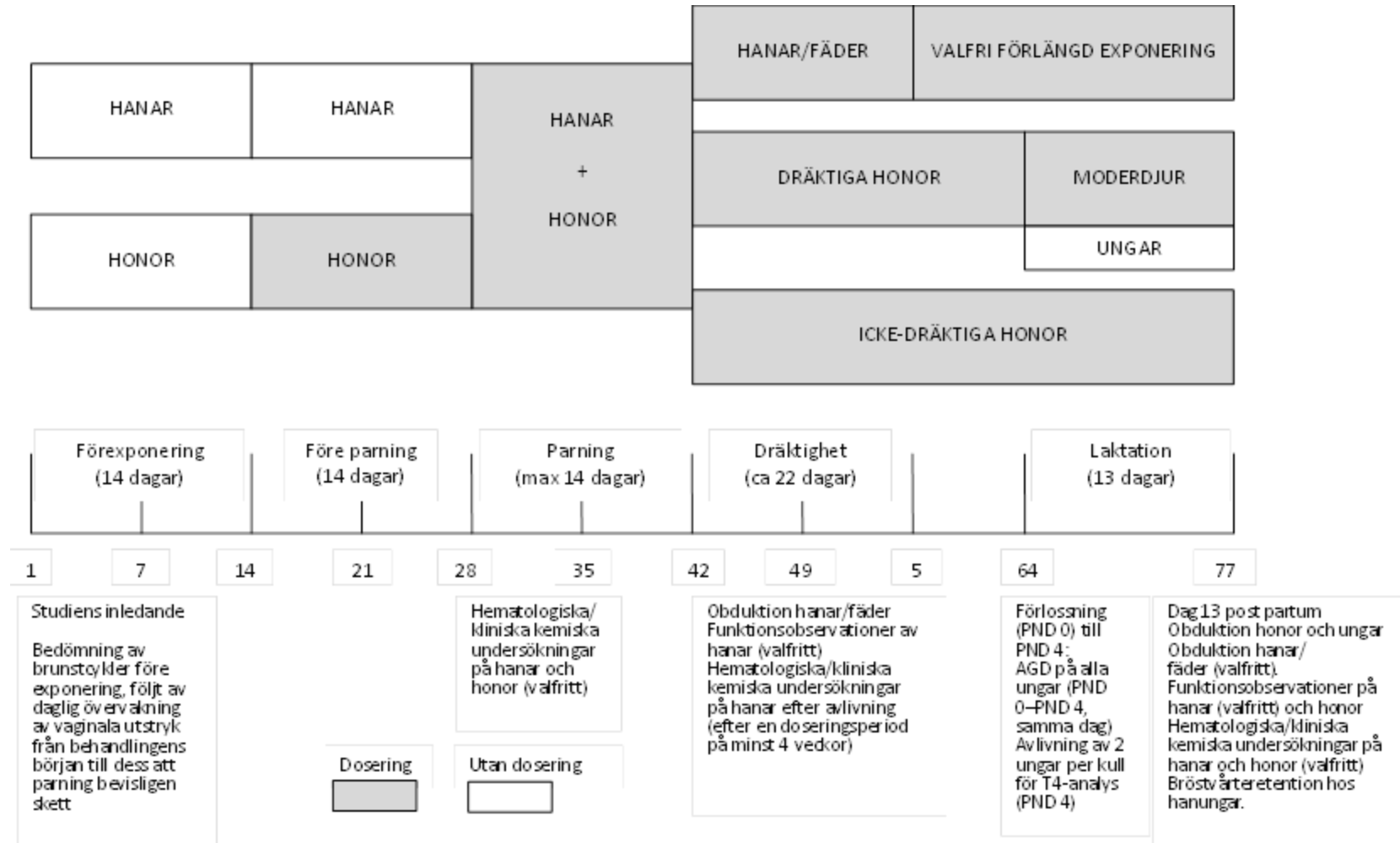
Testkemikalie: varje ämne eller blandning som testas med denna testmetod.

Tyreoid aktivitet är förmågan hos en kemikalie att agera som ett naturligt tyreoideahormon (t.ex. T₃) hos ett däggdjur.

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

FÖRSÖKSSCHEMA SOM VISAR STUDIENS MAXIMALA VARAKTIGHET, BASERAT PÅ EN 14-DAGARS PARNINGSPERIOD



Tillägg 3

SAMMANFATTNING I TABELLFORM AV EFFEKTER PÅ REPRODUKTION/UTVECKLING

IAKTTAGELSER	VÄRDEN				
Dosering (enheter).....	0 (kontroll)	...	...	...	...
Startade par (N)					
Ägglossningscykel (för oregelbundna cykler åtminstone medellängd och frekvens)					
Honor som bevisligen befruktats (N)					
Honor som blivit dräktiga (N)					
Befruktningsdag 1–5 (N)					
Befruktningsdag 6–... ⁽¹⁾ (N)					
Dräktighetsperiod ≤ 21 dagar (N)					
Dräktighetsperiod = 22 dagar (N)					
Dräktighetsperiod ≥ 23 dagar (N)					
Moderdjur med levande ungar (N)					
Moderdjur med levande ungar på dag 4 post partum (N)					
Implantationer/moderdjur (medel)					
Levande ungar/moderdjur vid födseln (medel)					
Levande ungar/moderdjur på dag 4 (medel)					
Könsfördelning (m/f) vid födseln (medel)					
Könsfördelning (m/f) på dag 4 (medel)					
Kullens vikt vid födseln (medel)					
Kullens vikt på dag 4 (medel)					
Ungarnas vikt vid födseln (medel)					
Ungarnas vikt vid tidpunkten för AGD-mätningen (medel – hanungar, medel – honungar)					
Ungarnas AGD på samma dag efter födseln, från födseln – dag 4 (medel – hanungar, medel – honungar, notera PND)					
Ungarnas vikt på dag 4 (medel)					
Ungarnas vikt på dag 13 (medel)					
Bröstvärteretention hos hanungarna på dag 13 (medel)					
ONORMALA UNGAR					

¹⁾ Parningsperiodens sista dag.

Moderdjur med 0					
Moderdjur med 1					
Moderdjur med ≥ 2					
FÖRLORAD AVKOMMA					
Prenatal (implantationer minus levande födda)					
Honor med 0					
Honor med 1					
Honor med 2					
Honor med ≥ 3					
Postnatal (levande födda minus levande ungar på PND 13)					
Honor med 0					
Honor med 1					
Honor med 2					
Honor med ≥ 3					

B.65 IN VITRO-MEMBRANBARRIÄRTTEST FÖR HUDKORROSION

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 435 (2015). Hudkorrosion innebär att det uppstår en irreversibel skada på huden i form av synlig nekros genom epidermis och in i dermis, efter applicering av en testkemikalie enligt definitionen i Förenta nationernas globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (1) och Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP-förordningen)¹. Denna testmetod, som motsvarar OECD:s uppdaterade testriktlinje 435, innefattar ett in vitro-membranbarriärtest som kan användas för att identifiera frätande kemikalier. I testmetoden används ett konstgjort membran som är utformat för att ge en liknande respons på frätande kemikalier som djurhud in situ.
2. Hudkorrosivitet har traditionellt bedömts genom applicering av testkemikalien på levande djurs hud och bedömning av omfattningen av vävnadsskador efter en fastställd tidsperiod (2). Förutom denna testmetod har ett antal andra in vitro-testmetoder godkänts som alternativ (3)(4) till standardförfarandet för in vivo-test på kaninhud (kapitel B.4 i denna bilaga, motsvarar OECD TG 404) för att identifiera frätande kemikalier (2). Enligt GHS-systemets strategi för stegvis testning och utvärdering för bedömning och klassificering av hudfrätande verkan och OECD:s vägledningsdokument om ett integrerat synsätt på testning och bedömning av hudirritation/hudkorrosion (IATA) (*Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Skin Irritation/Corrosion*) rekommenderas användning av validerade och vedertagna in vitro-testmetoder för modulerna 3 och 4 (1)(5). I vägledningsdokumentet om IATA beskrivs flera moduler som grupperar informationskällor och analysverktyg och där ges även i) vägledning om hur tillgängliga testdata och icke testdata kan integreras och användas i bedömningen av kemikaliers potential för hudirritation och hudkorrosion, och ii) förslag på hur man ska gå till väga när det krävs ytterligare testning, även när negativa resultat erhålls (5). I denna modulmetod kan positiva resultat från in vitro-testmetoder användas för att klassificera en kemikalie som frätande utan behov av djurförsök, och därigenom begränsa och förfinas användningen av djur och minska den smärta och ångest som kan uppstå om djur används för detta ändamål.

¹ Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006 (EUT L 353, 31.12.2008, s. 1).

3. Valideringsstudier har slutförts för in vitro-membranbarriärmodellen, som finns kommersiellt tillgänglig som Corrositex® (6)(7)(8). De visar en övergripande noggrannhet för att förutsäga hudkorrosivitet på 79 % (128/163), en sensitivitet på 85 % (76/89) och en specificitet på 70 % (52/74) för en databas med 163 ämnen och blandningar (7). Baserat på den bekräftade validiteten har denna validerade referensmetod (VRM) rekommenderats för användning som ett led i en stegvis teststrategi för att bedöma kemikaliers potential att orsaka hudkorrosion (5)(7). Innan en in vitro-membranbarriärmodell för hudkorrosion kan användas för lagstadgade ändamål bör metodens tillförlitlighet, relevans (noggrannhet) och begränsningar för det föreslagna användningsområdet bestämmas för att garantera dess likhet med VRM (9) i enlighet med de på förhand fastställda prestandastandarderna (PS) (10). OECD:s ömsesidiga erkännande av data kan endast garanteras efter det att eventuella föreslagna metoder, nya eller uppdaterade, som följer PS har granskats och inkluderats i motsvarande OECD-testriktlinje. För närvarande omfattas endast en in vitro-metod av OECD:s testriktlinje 435 och denna testmetod, nämligen den kommersiellt tillgängliga modellen Corrositex®.
4. Andra testmetoder för hudkorrosivitet baseras på användning av rekonstruerad human hud (OECD TG 431) (3) och isolerad rått hud (OECD TG 430) (4). Enligt denna testriktlinje delas frätande kemikalier även in i underkategorier, dvs. de tre GHS-underkategorierna för frätande verkan och FN:s tre transportförpackningsgrupper för faror i samband med frätande ämnen. Denna testriktlinje antogs första gången 2006 och uppdaterades 2015 för att överensstämma med vägledningsdokumentet om IATA och uppdatera förteckningen över kvalifikationsämnen.

DEFINITIONER

5. Definitioner av begreppen finns i tillägget.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

6. Det test som beskrivs i denna testmetod gör det möjligt att identifiera frätande testkemikalier och dela in dem i underkategorier enligt GHS/CLP (tabell 1). Testmetoden kan även användas för att fatta beslut om huruvida specifika kemikalieklasser är frätande eller ej, t.ex. organiska och oorganiska syror, syraderivat¹ och baser för vissa transporttestningsändamål (7) (11) (12). Denna testmetod beskriver ett generiskt förfarande som liknar den validerade referenstestmetoden (7). Eftersom denna testmetod inte ger

¹ ”Syraderivat” är en icke-specifik klassificering och definieras generellt som en syra som framställts från en kemikalie, antingen direkt eller genom modifiering eller delvis ersättning. Denna klass omfattar anhydrider, halosyror, salter och andra typer av kemikalier.

adekvat information om hudirritation bör nämnas att TM B.46 (motsvarande OECD TG 439) är särskilt avsedd för hälsoeffekten hudirritation in vitro (13). För en fullständig bedömning av lokala effekter på huden efter en enstaka dermal exponering se OECD:s vägledningsdokument om IATA (5).

Tabell 1: GHS-kategori och underkategorier för frätande verkan på huden (1)

Kategori för frätande verkan (kategori 1) (för myndigheter som inte använder underkategorier)	Underkategorier för potentiell frätande verkan ¹ (för myndigheter som använder underkategorier, inklusive CLP-förordningen)	Frätande på ≥ 1 av 3 djur	
		Exponering	Anmärkning
Frätande	Frätande, underkategori 1A	≤ 3 minuter	≤ 1 timme
	Frätande, underkategori 1B	> 3 minuter/ ≤ 1 timme	≤ 14 dagar
	Frätande, underkategori 1C	> 1 timme/ ≤ 4 timmar	≤ 14 dagar

7. En begränsning med den validerade referensmetoden (7) är att många icke frätande kemikalier och vissa frätande kemikalier kanske inte kommer i fråga för testning baserat på det inledande kompatibilitetstestet (se punkt 13). Vattenbaserade kemikalier med pH-värde i intervallet 4,5–8,5 kommer ofta inte i fråga för testning, men 85 % av de kemikalier som testades inom detta pH-intervall var icke frätande i djurförsök (7). In vitro-membranbarriärmetoden kan användas för att testa fasta ämnen (lösliga eller olösliga i vatten), vätskor (vattenbaserade eller icke vattenbaserade) samt emulsioner. Testkemikalier som inte orsakar en detekterbar förändring i kompatibilitetstestet (dvs. färgändring i det kemiska detektionssystemet för den validerade referenstestmetoden) kan inte testas med membranbarriärmetoden och bör därför testas med andra testmetoder.

TESTPRINCIP

8. Testsystemet består av två delar: en syntetisk makromolekylär biobarriär och ett kemiskt detektionssystem. I denna testmetod påvisas via det kemiska detektionssystemet membranbarriärskada som orsakas av testkemikalier med frätande verkan efter applicering av testkemikalien på den syntetiska makromolekylära membranbarriärens yta (7), och som kan antas bero på samma frätande mekanism(er) som på levande hud.

¹ I EU tillämpas tre underkategorier för frätande verkan på huden enligt CLP-förordningen, 1A, 1B och 1C.

9. Penetrationen av membranbarriären (eller genombrottet) kan mätas med hjälp av ett antal förfaranden eller kemiska detektionssystem, bland annat förändringar av färgen på ett pH-indikatorfärgämne eller andra egenskaper hos indikatorlösningen under barriären.
10. Det måste fastställas att membranbarriären är giltig, dvs. relevant och tillförlitlig, för den avsedda användningen. Detta kan till exempel göras genom att kontrollera att olika beredningar har likvärdiga barriäregenskaper, t.ex. att de kan upprätthålla en barriär mot icke frätande kemikalier och att kemikaliernas frätande egenskaper kan kategoriseras inom GHS-underkategorierna för frätande verkan (1). Klassificeringen beror på hur lång tid det tar för kemikalien att tränga igenom membranbarriären till indikatorlösningen.

DEMONSTRATION AV KOMPETENS

11. Före rutinanvändning av in vitro-membranbarriärmetoden bör laboratoriet visa den tekniska kvaliteten genom att korrekt klassificera de tolv kvalifikationsämnen som rekommenderas i tabell 2. När ett förtecknat ämne inte finns tillgängligt eller när så är motiverat kan ett annat ämne för vilket det finns adekvata in vivo- och in vitro-referensdata för (t.ex. från listan över referenskemikalier (10)) användas, förutsatt att samma urvalskriterier tillämpas som i tabell 1.

Tabell 2: Kvalifikationsämnen¹

Ämne ²	CAS-nr	Kemisk klass	GHS-underkategori in vivo ³	GHS-underkategori in vitro ³
Bortrifluoriddihydrat	13319-75-0	Oorganiska syror	1A	1A
Salpetersyra	7697-37-2	Oorganiska syror	1A	1A
Fosforpentaklorid	10026-13-8	Prekursorer för oorganiska syror	1A	1A
Valerylchlorid	638-29-9	Syraklorider	1B	1B
Natriumhydroxid	1310-73-2	Oorganiska baser	1B	1B
1-2-aminoethylpiperazin	140-31-8	Alifatiska aminer	1B	1B
Bensensulfonylchlorid	98-09-9	Syraklorider	1C	1C
N,N-dimetylbensylamin	103-83-3	Aniliner	1C	1C
Tetraetylenpentamin	112-57-2	Alifatiska aminer	1C	1C
Eugenol	97-53-0	Fenoler	NC	NC
Nonylakrylat	2664-55-3	Akrylater/metakrylater	NC	NC

Natriumvätekarbonat	144-55-8	Oorganiska salter	NC	NC

¹ De tolv ämnen som anges ovan inkluderar tre ämnen från var och en av de tre GHS-underkategorierna för frätande ämnen samt tre icke frätande ämnen. De finns lätt tillgängliga från kommersiella leverantörer. GHS-underkategorin baseras på resultaten från in vivo-provningar av hög kvalitet. Ämnena har tagits från en lista med 40 referensämnen som ingår i minimiförteckningen över kemikalier som ska användas för att visa att testmetoder som strukturellt och funktionellt liknar den validerade referenstestmetoden är noggranna och tillförlitliga, och valdes ut bland de 163 referenskemikalier som ursprungligen användes för att validera referenstestmetoden (Corrositex[®]) (7) (10) (14). Syftet med denna urvalsprocess var att i största möjliga mån ta med kemikalier som är representativa för graden av korrosivitetsrespons (t.ex. icke frätande, FN:s förpackningsgrupper I, II och III för frätande ämnen) som kan mätas eller uppskattas med den validerade referenstestmetoden, är representativa för de kemikalieklasser som används under valideringsprocessen, har väldefinierade kemiska strukturer, ger reproducerbara resultat i den validerade referenstestmetoden, ger definitiva resultat vid användning av in vivo-referenstestet, finns kommersiellt tillgängliga, och inte ger upphov till alltför höga kostnader för bortskaffande (14).

² Ämnen som testats rena eller med renhetsgrad $\geq 90\%$

³ FN:s motsvarande förpackningsgrupper är I, II eller III, för GHS-underkategorierna 1A, 1B och 1C. NC: Icke frätande.

FÖRFARANDE

12. I följande stycken beskrivs komponenterna i och förfarandena för en testmetod med en konstgjord membranbarriär för bedömning av frätande verkan (7)(15), baserad på den nuvarande validerade referensmetoden, dvs. den kommersiellt tillgängliga Corrositex[®]. Membranbarriären och kompatibilitets-/indikator- och kategoriseringslösningarna kan konstrueras, beredas eller erhållas kommersiellt, såsom den validerade referensmetoden Corrositex[®]. Det finns ett exempel på testmetodprotokoll för den validerade referenstestmetoden (7). Provningen bör utföras i rumstemperatur (17–25 °C) och komponenterna bör uppfylla följande villkor:

Kompatibilitetstest för testkemikalien

13. Innan membranbarriärtestet påbörjas görs ett kompatibilitetstest för att fastställa om det kemiska detektionssystemet kan detektera testkemikalien. Om detektionssystemet inte detekterar testkemikalien är membranbarriärtestmetoden inte lämplig för att utvärdera den aktuella testkemikaliens potentiella frätande verkan, och en annan testmetod bör väljas. Detektionssystemet och de exponeringsförhållanden som används för kompatibilitetstestet bör avspegla exponeringen i membranbarriärtestet.

Provning av testkemikaliens tidskategori

14. En testkemikalie som är lämplig för testmetoden enligt kompatibilitetstestet bör även genomgå ett tidskategoritest, dvs. ett screeningtest för att skilja mellan svaga och starka syror eller baser. I den validerade referenstestmetoden används till exempel ett tidskategoritest för att avgöra vilken av två tidsskalor som bör användas beroende på om betydande syra- eller basreserver detekteras. Två olika tidsskalor för genombrott för att fastställa frätande verkan och GHS-underkategori för frätande verkan bör användas, baserat på testkemikaliens syra- eller basreserv.

MEMBRANBARRIÄRTESTMETODENS KOMPONENTER

Membranbarriär

15. Membranbarriären består av två komponenter: en proteinhaltig makromolekylär vattenbaserad gel och ett permeabelt stödjande membran. Den proteinhaltiga gelen bör vara impermeabel för vatten och fasta ämnen, men kan korrodera och bli permeabel. Den färdiga membranbarriären bör förvaras under på förhand fastställda förhållanden som har visat sig förebygga försämringar av gelen, t.ex. att den torkar, att det uppstår mikrobstillväxt eller att den förändras eller spricker, vilket försämrar prestandan. En godtagbar förvaringsperiod bör fastställas, och membranbarriärberedningarna bör inte användas efter den perioden.
16. Det permeabla stödjande membranet ger mekaniskt stöd till de proteinhaltiga gelen under gelbildningsprocessen och exponeringen för testkemikalien. Det stödjande membranet bör förebygga att gelen sjunker eller skiftar och bör ha hög permeabilitet för alla testkemikalier.
17. Den proteinhaltiga gelen, som består av protein, t.ex. keratin, kollagen eller blandningar av proteiner som bildar en gelmatris, fungerar som målet för testkemikalien. Det proteinhaltiga materialet placeras på det stödjande membranets yta och får bilda en gel innan membranbarriären placeras ovanpå indikatorlösningen. Den proteinhaltiga gelen bör ha en homogen tjocklek och densitet, utan luftbubblor eller defekter som kan påverka dess funktionella integritet.

Kemiskt detektionssystem

18. Indikatorlösningen, som är samma lösning som används för kompatibilitetstestet, bör reagera på förekomst av testkemikalien. Ett pH-indikatorfärgämne eller en kombination av sådana färgämnen, t.ex. kresolrött och metylorange som skiftar färg vid förekomst av testkemikalien bör användas. Mätssystemet kan vara visuellt eller elektroniskt.
19. Relevansen och tillförlitligheten hos detektionssystem som har utformats för att detektera testkemikaliens väg genom barriärmembranet bör bedömas för att fastställa vilka kemikalier som kan detekteras och de kvantitativa detektionsgränserna.

TESTPRESTANDA

Montering av testmetodens komponenter

20. Membranbarriären placeras i en vial (eller ett provrör) som innehåller indikatorlösningen så att det stödjande membranet har fullständig kontakt med indikatorlösningen och luftbubblor undviks. Det är viktigt att se till att barriärens integritet bibehålls.

Applicering av testkemikalien

21. En lämplig mängd av testkemikalien, t.ex. 500 µl av en vätska eller 500 mg av ett fast ämne i finfördelad pulverform (7) varvas försiktigt i lager på membranbarriärens övre yta och fördelas jämnt. Ett lämpligt antal replikat, t.ex. fyra (7) bereds för varje testkemikalie och motsvarande kontroller (se punkterna 23–25). Den tid det tar att applicera testkemikalien på membranbarriären registreras. För att se till att korta frättningsperioder registreras korrekt appliceras testkemikalien i replikatbehållarna i omgångar.

Mätning av penetration av membranbarriären

22. Varje behållare övervakas och tidpunkten för den första förändringen i indikatorlösningen registreras, dvs. när barriären penetreras. Därefter mäts tiden mellan applicering och penetration av membranbarriären.

Kontroller

23. I tester där en vehikel eller ett lösningsmedel används tillsammans med testkemikalien bör de vara kompatibla med membranbarriärsystemet, dvs. inte ändra dess integritet och testkemikalien frätande verkan. I tillämpliga fall bör lösningsmedelskontrollen (vehikelkontrollen) testas parallellt med testkemikalien för att visa att lösningsmedlet (vehikeln) är kompatibelt med membranbarriärsystemet.
24. En positiv (frätande) kontroll med medelhög frätande aktivitet (t.ex. 110 ± 15 mg natriumhydroxid (GHS-kategori för frätande verkan 1B) (7), bör testas parallellt med testkemikalien för att bedöma om testsystemet fungerar på ett godtagbart sätt. En andra positiv kontroll i samma kemiska klass som testkemikalien kan vara användbar för en bedömning av den frätande kemikalien relativa frätande potential. De valda positiva kontrollerna bör ha en medelhög frätande verkan (t.ex. GHS-underkategori 1B) för att det ska vara möjligt att upptäcka förändringar av penetrationstiden som kan vara oacceptabelt längre eller kortare än det fastställda referensvärdet, eftersom det tyder på att testsystemet inte fungerar ordentligt. För detta ändamål är extremt frätande (GHS-underkategori 1A) eller icke frätande kemikalier av begränsad nytta. En frätande kemikalie i GHS-underkategori 1B gör det möjligt att detektera för snabba eller för långsamma genombrottstider. En svagt frätande kemikalie (GHS-underkategori 1C) kan användas som positiv kontroll för att mäta testmetodens förmåga att kontinuerligt skilja mellan svagt frätande och icke frätande kemikalier. Oavsett tillvägagångssätt bör ett godtagbart responsintervall för den positiva kontrollen utvecklas, baserat på det historiska intervallet av genombrottstider för de positiva kontroller som används, t.ex. medelvärdet ± 2 –3 standardavvikelser. I varje studie bör den exakta genombrottstiden fastställas för den positiva kontrollen så att avvikelser utanför det godtagbara intervallet kan upptäckas.
25. En negativ (icke frätande) kontroll, t.ex. 10 % citronsyra, 6 % propionsyra (7), bör också testas parallellt med testkemikalien som en ytterligare kvalitetskontroll för att visa membranbarriärens funktionella integritet.

Acceptanskriterier för studien

26. Enligt de fastställda tidsparametrarna för varje underkategori för frätande verkan i GHS-systemet används tiden (i minuter) från det att en testkemikalie appliceras på membranbarriären fram till dess att barriären penetreras för att uppskatta testkemikaliens frätande verkan. För att en studie ska anses vara godtagbar bör den parallella positiva kontrollen visa den förväntade responstiden för penetration (t.ex. 8–16 minuters genombrottstid för natriumhydroxid om det används som positiv kontroll). Den parallella negativa kontrollen bör inte visa frätande verkan och den parallella lösningsmedelskontrollen bör i förekommande fall varken visa frätande verkan eller ändra testkemikaliens frätande potential. Innan en metod som följer denna testmetod börjar användas rutinmässigt bör laboratorierna visa att de har teknisk kompetens genom att använda de tolv ämnen som rekommenderas i tabell 2. För nya ”me too”-metoder som utvecklas enligt denna testmetod och som strukturellt och funktionellt sett liknar den validerade referensmetoden (14) bör de på förhand fastställda prestandastandarderna användas för att visa den nya metodens tillförlitlighet och noggrannhet innan den används för lagstadgad testning (10).

Tolkning av resultat och korrosivitetsklassificering av testkemikalier

27. Tiden (i minuter) från det att testkemikalien appliceras på membranbarriären fram till dess att barriären penetreras används för att klassificera testkemikalien enligt GHS-underkategorierna för frätande kemikalier (1), och i tillämpliga fall FN:s förpackningsgrupper (16). Bryttidsvärdena för var och en av de tre underkategorierna för frätande verkan fastställs för varje föreslagen testmetod. De slutliga besluten om bryttider bör fattas med hänsyn till behovet av att minimera underklassificering av riskerna för frätande verkan (dvs. falska negativa värden). I denna testriktlinje bör bryttiderna för Corrositex® enligt tabell 3 användas, eftersom Corrositex® är den enda testmetod som för närvarande omfattas av testriktlinjen (7).

Tabell 3: Prediktionsmodellen Corrositex®

Genomsnittlig bryttid (i minuter)		GHS-prediktion ³
Testkemikalier i kategori 1 ¹ (fastställda med hjälp av metodens kategoriseringstest)	Testkemikalier i kategori 2 ² (fastställda med hjälp av metodens kategoriseringstest)	
0–3 min.	0–3 min.	Frätande valfri underkategori 1A
> 3 till 60 min.	> 3 till 30 min.	Frätande valfri underkategori 1B
> 60 till 240 min.	> 30 till 60 min.	Frätande valfri underkategori 1C

> 240 min.	> 60 min.	Icke frätande

¹ Testkemikalier med hög syra-/basreserv (6)

² Testkemikalier med låg syra-/basreserv (6)

³ GHS-underkategorierna 1A, 1B och 1C motsvarar FN:s förpackningsgrupper I, II respektive III.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

28. Tiden (i minuter) mellan applicering och barriärpenetration för testkemikalien och positiv(a) kontroll(er) bör rapporteras i tabellform som individuella replikatdata och som medelvärden $\pm$ standardavvikelse för varje test.

Testrapport

29. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie och kontrollämnen:

- Monokomponentämne: kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.
- Multikomponentämne, UVCB-ämne och blandning: karakteriseras så långt som möjligt genom kemikalieidentifiering (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.
- Fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.
- Ursprung, satsnummer om sådant finns.
- Eventuell behandling av testkemikalien/kontrollämnet före testning (t.ex. uppvärmning, malning).
- Testkemikalien's stabilitet, sista förbrukningsdatum eller sista datum för upprepad analys, om känt.
- Lagringsförhållanden.

Vehikel:

- Identifieringsdata, koncentration (om tillämpligt), volym som har använts.
- Motivering för val av vehikel.

Använd in vitro-barriärmodell och använt protokoll, med visad noggrannhet och tillförlitlighet.

Testbetingelser:

- Beskrivning av använda apparater och rutiner för förberedelse.
- Källa och sammansättning för den använda in vitro-membranbarriären.
- Indikatorlösningens sammansättning och egenskaper.
- Detektionsmetod.
- Mängder av testkemikalien och kontrollämnena.
- Antal replikat.
- Beskrivning och motivering av tidskategoriseringstestet.
- Appliceringsmetod.
- Observationstider.
- Beskrivning av de utvärderings- och klassificeringskriterier som tillämpats.
- Demonstrationen av kompetens för utförande av testmetoden ska göras före rutinanvändning, genom testning av kvalifikationsämnen.

Resultat:

- Tabelluppställning av individuella rådata från individuella test- och kontrollurval för varje replikat.
- Beskrivning av övriga observerade effekter.
- Härledda klassificeringar med hänvisning till prediktionsmodell och/eller beslutskriterier.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser

LITTERATUR

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), First Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Se http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) Kapitel B.4 i denna bilaga, Akut hudirritation/hudkorrosion.
- (3) Kapitel B.40a i denna bilaga, Hudkorrosion in vitro: Testmetod med rekonstruerad human epidermis (RhE).
- (4) Kapitel B.40 i denna bilaga, Hudkorrosion in vitro: Bestämning av transkutant elektriskt motstånd (TER).
- (5) OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, 483–524.
- (7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (nr 99–4495.)
- (8) Gordon V.C., Harvell J.D. och Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37–45.
- (9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, nr 34.
- (10) OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris. Se <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf>.

- (11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. ATLA 29, 96–97.
- (12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (femte översynen). (20 september 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.
- (13) Kapitel B.46 i denna bilaga, Hudirritation in vitro: Testmetod med rekonstruerad human epidermis. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH-publikation nr 04-4510. Se http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.
- (14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Se <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf>.
- (15) United Nations (UN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Se http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Tillägg

DEFINITIONER

Noggrannhet: anger hur väl testresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Det är ett mått på testmetodens prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (9).

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Kemiskt detektionssystem: Ett visuellt eller elektroniskt mätsystem med en indikatorlösning som reagerar på en testkemikalie, t.ex. genom en ändring i ett pH-indikatorfärgämne eller en kombination av sådana färgämnen, som skiftar färg vid förekomst av testkemikalien, eller genom andra typer av kemiska eller elektrokemiska reaktioner.

Konkordans: ett mått på testmetodens prestanda för sådana testmetoder som ger kategoriska resultat, och en aspekt av relevans. Termen används omväxlande med noggrannhet och definieras som andelen av alla testade kemikalier som klassificeras korrekt som positiva eller negativa (9). Konkordansen är direkt beroende av förekomsten av positiva värden i den testkemikalie som undersöks (9).

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals): ett system för att klassificera ämnen och blandningar enligt standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker och informera om resultaten genom t.ex. piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad i syfte att informera om ämnenas skadliga effekter för att skydda personer (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) och miljön (1).

IATA: integrerat synsätt på testning och bedömning (Integrated Approach to Testing and Assessment).

Blandning: blandning eller lösning som består av två eller flera ämnen.

Monokomponentämne: ett ämne, definierat av sin kvantitativa sammansättning, där minst en huvudsaklig beståndsdel utgör minst 80 viktprocent.

Multikomponentämne: ett ämne, definierat av sin kvantitativa sammansättning, där fler än en huvudsaklig beståndsdel förekommer i en koncentration på ≥ 10 viktprocent och < 80 viktprocent. Ett multikomponentämne är resultatet av en tillverkningsprocess. Skillnaden mellan blandningar och multikomponentämnen är att en blandning erhålls genom att två eller flera ämnen blandas utan kemisk reaktion. Ett multikomponentämne är resultatet av en kemisk reaktion.

NC: Icke-frätande.

Prestandastandarder: standarder som baseras på en validerad testmetod och som utgör grunden för utvärdering av jämförbarheten för en föreslagen testmetod som är mekaniskt och funktionellt likartad. Dessa standarder omfattar i) testmetodens grundläggande komponenter, ii) en minimiförteckning med referenskemikalier som valts ut från de kemikalier som använts för att visa att den validerade metoden fungerar tillfredsställande, och iii) de jämförbara nivåer av tillförlitlighet och noggrannhet, på grundval av vad som erhållits för den validerade testmetoden, som man bör kunna påvisa för den föreslagna testmetoden när den utvärderas med användning av minimiförteckningen med referenskemikalier (9).

Relevans: beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida detta förhållande är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl man genom testet korrekt kan mäta och förutse den biologiska effekt det gäller. Relevans omfattar också överväganden om en testmetods noggrannhet (konkordans) (9).

Tillförlitlighet: mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när den utförs med hjälp av samma protokoll. Den bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier (9).

Sensitivitet: den andel av alla positiva/aktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testet. Det är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (9).

Hudkorrosion in vivo: en irreversibel skada på huden, i form av synlig nekros genom epidermis och in i dermis, efter applicering av en testkemikalie i upp till fyra timmar. Frätningsreaktioner karakteriseras av sår, blödning, blodiga sårskorpor och, vid slutet av observationsperioden på 14 dagar, avfärgning genom blekning av huden, hela områden med alopeci (håravfall) och ärr. Histopatologi bör övervägas för att bedöma tveksamma skador.

Specificitet: den andel av alla negativa/inaktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testet. Det är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (9).

Ämne: kemiskt grundämne och föreningar av detta grundämne i naturlig eller tillverkad form, inklusive de eventuella tillsatser som är nödvändiga för att bevara dess stabilitet och sådana föreningar som härrör från tillverkningsprocessen, men exklusive eventuella lösningsmedel som kan avskiljas utan att det påverkar ämnets stabilitet eller ändrar dess sammansättning.

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

UVCB-ämne: ämne med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter och biologiskt material.

B.66 IN VITRO-TESTER MED STABILT TRANSFEKTERAD TRANSAKTIVERING FÖR DETEKTION AV ÖSTROGENRECEPTORERS AGONISTER OCH ANTAGONISTER

ALLMÄN INLEDNING

Prestandabaserad OECD-testriktlinje

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 455 (2016). TG 455 är en prestandabaserad testriktlinje (PBTG) som beskriver metoden för in vitro-tester med stabilt transfekterad transaktivering för detektion av östrogenreceptorers agonister och antagonister (ER TA-tester). Den består av flera mekanistiskt och funktionellt liknande testmetoder för att identifiera östrogenreceptorers (dvs. ER α och/eller ER β) agonister och antagonister, och syftar till att underlätta nya liknande eller modifierade testmetoder enligt de valideringsprinciper som anges i OECD:s vägledningsdokument om validering och internationellt godtagande av nya eller uppdaterade testmetoder för farobedömning (*OECD Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*) (1). De fullständigt validerade referenstestmetoder (tilläggen 2 och 3) som ligger till grund för denna prestandabaserade riktlinje är
 - STTA-testet (stabilt transfekterad transaktivering) (2), som använder cellinjen (h) ER α -HeLa-9903, och
 - VM7Luc ER TA-testet (3), som använder cellinjen VM7Luc4E2¹, och till övervägande del uttrycker hER α med visst bidrag från hER β (4)(5).

Prestandastandarder (PS) (6) (7) finns tillgängliga och bör användas vid utveckling och validering av liknande tester för samma effekter. De möjliggör snabba ändringar av PBTG 455, så att nya liknande tester kan läggas till i en uppdaterad PBTG. Liknande tester kommer dock att läggas till först efter det att de har granskats och OECD har bekräftat att prestandastandarderna är uppfyllda. De tester som ingår i TG 455 kan användas obehindrat för att uppfylla medlemsländernas krav på testresultat om transaktivering av östrogenreceptor och omfattas av OECD:s rådslag om ömsesidigt erkännande av data.

¹ Före juni 2016 betecknades denna cellinje som BG1Luc. BG-1-cellerna beskrevs först av Geisinger et al. (1998) (35), och karakteriserades senare av forskare vid National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (36). Relativt nyligen upptäckte man att det finns två olika varianter av BG-1-celler som används av forskare, BG-1 Fr och BG-1 NIEHS. En djupgående analys, inklusive DNA-testning, av dessa två varianter av cellinjen BG-1, som utfördes av Li och medarbetare (2014) (37), visade att BG-1 Fr är unik och att BG-1 NIEHS, dvs. den cellinje som ursprungligen användes för att utveckla metoden, inte är cellinjen BG1 från human äggstockscancer, utan i stället är en variant av cellinjen MCF7 från human bröstcancer. Den cellinje som används i testet, som ursprungligen benämndes BG1Luc4E2 (38), kommer nu att betecknas som VM7Luc4E2 ("V" = variant, "M7" = MCF7-celler). Testet kommer nu att betecknas VM7Luc ER TA. Detta innebär visserligen ett ändrat ursprung för den cellinje som testet bygger på, men det påverkar inte publicerade valideringsstudier eller nyttan med och tillämpningen av denna metod för screening av östrogena/antiöstrogena kemikalier.

Bakgrund och principer för de tester som ingår i denna testmetod

2. OECD inledde en högprioriterad verksamhet under 1998 för att se över befintliga och ta fram nya testriktlinjer för screening och testning av potentiellt hormonstörande kemikalier. OECD:s ramverk för testning och bedömning av potentiellt hormonstörande kemikalier (OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters) sågs över 2012. Det ursprungliga och det reviderade ramverket är bifogade som bilagor till OECD:s vägledningsdokument om standardiserade testriktlinjer för utvärdering av kemikaliers hormonstörande egenskaper (8). Ramverket består av fem nivåer, som var och en motsvarar en nivå av biologisk komplexitet. De ER-transaktiveringstester som beskrivs i denna testmetod tillhör nivå 2, som omfattar in vitro-tester som ger data om utvalda endokrinmekanismer/vägar. Denna testmetod består av in vitro-transaktiveringstester (TA) som är utformade för att identifiera östrogenreceptorantagonister och -agonister.
3. Östrogenernas interaktion med östrogenreceptorer kan påverka transkriptionen av östrogenkontrollerade gener, vilket kan leda till induktion eller inhibition av cellulära processer, även sådana som är nödvändiga för cellförökning, normal fosterutveckling och fortplantningsfunktionen (9)(10)(11). Störningar i normala östrogensystem kan utlösa negativa effekter på den normala utvecklingen (ontogenin), den reproduktiva hälsan och fortplantningssystemets integritet.
4. In vitro-transaktiveringstester grundas på en direkt eller indirekt interaktion mellan ämnena och en specifik receptor som reglerar transkriptionen av en rapportgenprodukt. Sådana tester har i stor utsträckning använts för att utvärdera det genuttryck som regleras av specifika nukleära receptorer, t.ex. östrogenreceptorer (12) (13) (14) (15) (16). De har föreslagits för detektering av östrogen transaktivering som regleras av östrogenreceptorer (17) (18) (19). Det finns minst två stora undertyper av nukleära östrogenreceptorer, α och β , som kodas av olika gener. De respektive proteinerna har olika biologiska funktioner, olika vävnadsdistribution och olika bindningsaffinitet hos liganderna (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). Nukleära ER α medierar den klassiska östrogena responsen (27)(28)(29)(30), och de flesta modeller som för närvarande utvecklas för att mäta aktivering eller inhibering av östrogenreceptorer är därför specifika för ER α . Metoderna används för att identifiera kemikalier som aktiverar (eller inhiberar) östrogenreceptorerna efter ligandbindning, efter vilket receptor–ligand-komplexet binder sig till specifika DNA-responselement och transaktiverar en rapportgen, vilket i sin tur leder till ökat celluttryck hos ett markörprotein. Olika responser från rapportgener kan användas i dessa tester. I luciferasbaserade system omvandlar luciferasenzymet luciferassubstratet till en bioluminiscent produkt som kan mätas kvantitativt med en luminometer. Andra exempel på vanliga rapportgener är fluorescerande protein och *LacZ*-genen, som kodar för β -galaktosidas, en enzymprodukt som kan omvandla det färglösa substratet X-gal (5-brom-4-klor-indolyl-galaktopyranosid) till en blå produkt som kan kvantifieras med en spektrofotometer. Dessa rapportgener kan utvärderas snabbt och till låg kostnad med kommersiellt tillgängliga testkit.

5. Valideringsstudier av STTA- och VM7Luc TA-testerna har visat att de är relevanta och tillförlitliga för det avsedda syftet (3) (4) (5) (30). Prestandastandarder för luminiscensbaserade ER TA-tester med användning av bröstcellinjer ingår i *ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals* (3). Dessa prestandastandarder har modifierats för att vara tillämpliga på både STTA- och VM7Luc TA-metoderna (2).
6. Definitioner och förkortningar som används i denna testmetod beskrivs i tillägg 1.

Omfattning av och begränsningar hos transaktiveringstester

7. Dessa tester föreslås för screening- och prioriteringsändamål, men kan även ge mekanistisk information som kan användas i en sammanvägd bedömning. De behandlar transaktivering som inducerats genom kemisk bindning till östrogenreceptorer i ett in vitro-system. Resultaten bör således inte extrapoleras direkt till det intakta endokrina systemets komplexa signalering och reglering in vivo.
8. Transaktivering medierad av östrogenreceptorer är en av de viktigaste mekanismerna för hormonstörning, även om hormonstörningar även kan uppstå genom andra mekanismer, exempelvis i) interaktioner med andra receptorer och enzymssystem inom det endokrina systemet, ii) hormonsyntes, iii) metabolisk aktivering och/eller inaktivering av hormoner, iv) fördelningen av hormoner till målvävnader, och v) clearance av hormoner från kroppen. Inget av testerna i denna testmetod behandlar dessa verkningssätt.
9. Denna testmetod behandlar kemikaliers förmåga att aktivera (dvs. agera som agonister) och även att dämpa (dvs. agera som antagonister) transkription som är beroende av östrogenreceptorer. En del kemikalier kan, beroende på celltyp, uppvisa både agonistisk och antagonistisk aktivitet, och benämns selektiva östrogenreceptormodulatorer (SERM). Kemikalier som visar negativt resultat i dessa tester kan utvärderas i ett test av östrogenreceptorbindning innan slutsatsen dras att kemikalien inte binder till receptorn. Dessutom kommer testerna sannolikt endast att ge information om det ursprungliga ämnet, med tanke på in vitro-cellsystemens begränsade metaboliska kapacitet. Med tanke på att endast enstaka ämnen användes under valideringen har analysens tillämplighet på testblandningar inte behandlats. Testmetoden är emellertid teoretiskt tillämplig på testning av multikomponentämnen, UVCB-ämnen och blandningar. Innan testmetoden används på ett multikomponentämne, UVCB-ämne eller en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man överväga om, och i så fall varför, den kan ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste testas enligt lag.
10. I informationssyfte innehåller tabell 1 agonist-testresultaten för de 34 ämnen som testades i båda de fullständigt validerade referenstestmetoder som beskrivs i denna testmetod. Av dessa ämnen är 26 klassificerade som definitiva ER-agonister och 8 som negativa baserat på publicerade rapporter, inklusive in vitro-tester av

östrogenreceptorbindning och transaktivering och/eller uterotroft test (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34). Tabell 2 innehåller antagonist-testresultaten för de 15 ämnen som testades i båda de fullständigt validerade referenstestmetoder som beskrivs i denna testmetod. Av dessa ämnen är 4 klassificerade som definitiva/förmodade ER-agonister och 10 som negativa baserat på publicerade rapporter, inklusive in vitro-tester av östrogenreceptorbindning och transaktivering (2) (3) (18) (31). När det gäller de data som sammanfattas i tabellerna 1 och 2 överensstämde de två referenstestmetoderna till 100 procent i klassificeringarna av alla ämnen utom ett (Mifepriston) för antagonisttest, och varje ämne klassificerades korrekt som ER-agonist/antagonist eller som negativt. Kompletterande information om denna grupp av kemikalier och ytterligare kemikalier som har testats i STTA- och VM7Luc ER TA-testerna under valideringsstudierna ges i prestandastandarderna för ERTA (6)(7), tillägg 2 (tabellerna 1, 2 och 3).

Tabell 1: Översikt över resultaten från STTA- och VM7Luc ER TA-testerna för ämnen som testats i de båda agonisttesterna och klassificerats som ER-agonister (POS) eller som negativa (NEG)

	Ämne	CAS-nr	STTA – test 1			VM7Luc ER TA – test 2		Datakälla för klassificering 4		
			ER TA Aktivitet	PC10-värde (M)	PC50-värde ^b (M)	ER TA-aktivitet	EC50-värde b,3 (M)	Övriga ER TA ^c	ER Bindemedel	Uterotrof
1	17β-östradiol	50-28-2	POS	<1,00 × 10-11	<1,00 × 10-11	POS	5,63 × 10-12	POS (227/227)	POS	POS
2	17α-östradiol	57-91-0	POS	7,24 × 10-11	6,44 × 10-10	POS	1,40 × 10-9	POS(11/11)	POS	POS
3	17α-etinylöstradiol	57-63-6	POS	<1,00 × 10-11	<1,00 × 10-11	POS	7,31 × 10-12	POS(22/22)	POS	POS
4	17β-trenbolon	10161-33-8	POS	1,78 × 10-8	2,73 × 10-7	POS	4,20 × 10-8	POS (2/2)	NT	NT
5	19-nortestosteron	434-22-0	POS	9,64 × 10-9	2,71 × 10-7	POS	1,80 × 10-6	POS (4/4)	POS	POS
6	4-kumylfenol	599-64-4	POS	1,49 × 10-7	1,60 × 10-6	POS	3,20 × 10-7	POS (5/5)	POS	NT
7	4-tert-oktylfenol	140-66-9	POS	1,85 × 10-9	7,37 × 10-8	POS	3,19 × 10-8	POS (21/24)	POS	POS
8	Apigenin	520-36-5	POS	1,31 × 10-7	5,71 × 10-7	POS	1,60 × 10-6	POS (26/26)	POS	NT
9	Atrazin	1912-24-9	NEG	-	-	NEG	-	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Bisfenol A	80-05-7	POS	2,02 × 10-8	2,94 × 10-7	POS	5,33 × 10-7	POS (65/65)	POS	POS
11	Bisfenol B	77-40-7	POS	2,36 × 10-8	2,11 × 10-7	POS	1,95 × 10-7	POS (6/6)	POS	POS
12	Bensylbutylftalat	85-68-7	POS	1,14 × 10-6	4,11 × 10-6	POS	1,98 × 10-6	POS (12/14)	POS	NEG
13	Kortikosteron	50-22-6	NEG	-	-	NEG	-	NEG (6/6)	NEG	NT
14	Kumestrol	479-13-0	POS	1,23 × 10-9	2,00 × 10-8	POS	1,32 × 10-7	POS (30/30)	POS	NT
15	Daidzein	486-66-8	POS	1,76 × 10-8	1,51 × 10-7	POS	7,95 × 10-7	POS (39/39)	POS	POS
16	Dietylstilbestrol	56-53-1	POS	<1,00 × 10-11	2,04 × 10-11	POS	3,34 × 10-11	POS (42/42)	POS	NT
17	Dibutylftalat	84-74-2	POS	4,09 × 10-6		POS	4,09 × 10-6	POS (6/11)	POS	NEG
18	Etylparaben	120-47-8	POS	5,00 × 10-6	(ej PC50)	POS	2,48 × 10-5	POS		NT
19	Östron	53-16-7	POS	3,02 × 10-11	5,88 × 10-10	POS	2,34 × 10-10	POS (26/28)	POS	POS
20	Genistein	446-72-0	POS	2,24 × 10-9	2,45 × 10-8	POS	2,71 × 10-7	POS (100/102)	POS	POS
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	-	-	NEG	-	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Kaempferol	520-18-3	POS	1,36 × 10-7	1,21 × 10-6	POS	3,99 × 10-6	POS (23/23)	POS	NT
23	Kepon	143-50-0	POS	7,11 × 10-7	7,68 × 10-6	POS	4,91 × 10-7	POS (14/18)	POS	NT
24	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	-	-	NEG	-	NEG (2/2)	NEG	NT

25	Linuron	330-55-2	NEG	-	-	NEG	-	NEG (8/8)	NEG	NT
26	meso-hexestrol	84-16-2	POS	$<1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	POS	$1,65 \times 10^{-11}$	POS (4/4)	POS	NT
27	Metyltestosteron	58-18-4	POS	$1,73 \times 10^{-7}$	$4,11 \times 10^{-6}$	POS	$2,68 \times 10^{-6}$	POS (5/6)	POS	NT
28	Morin	480-16-0	POS	$5,43 \times 10^{-7}$	$4,16 \times 10^{-6}$	POS	$2,37 \times 10^{-6}$	POS (2/2)	POS	NT
29	Noretynodrel	68-23-5	POS	$1,11 \times 10^{-11}$	$1,50 \times 10^{-9}$	POS	$9,39 \times 10^{-10}$	POS (5/5)	POS	NT
30	p,p'-metoxiklor	72-43-5	POS	$1,23 \times 10^{-6}$	(ej PC50)b	POS	$1,92 \times 10^{-6}$	POS (24/27)	POS	POS
31	Fenobarbital	57-30-7	NEG	-	-	NEG	-	NEG (2/2)	NEG	NT
32	Reserpin	50-55-5	NEG	-	-	NEG	-	NEG (4/4)	NEG	NT
33	Spironolakton	52-01-7	NEG	-	-	NEG	-	NEG (4/4)	NEG	NT
34	Testosteron	58-22-0	POS	$2,82 \times 10^{-8}$	$9,78 \times 10^{-6}$	POS	$1,75 \times 10^{-5}$	POS (5/10)	POS	NT

Förkortningar: CAS-nr = Chemical Abstracts Service Registry Number. M = molar. EC50 = halva den maximala effektiva koncentrationen av testämnet. NEG = negativ. POS = positiv. NT = Inte testat. PC10 (och PC50) = koncentration av ett testämne vid vilken responsen är 10 % (eller 50 % för PC50) av den respons som orsakas av den positiva kontrollen (E2, 1nM) i varje platta.

a) Vanliga ämnen som testas i STTA- och VM7Luc ER TA-testerna och har benämnts som ER-agonister eller negativa. De används för att utvärdera noggrannheten i valideringsstudien för VM7Luc ER TA (ICCVAM VM7Luc ER TA Evaluation Report, tabell 4-1 (3)).

b) Högsta koncentration som testats i avsaknad av begränsningar på grund av cytotoxicitet eller olöslighet var 1×10^{-5} M (STTA-test) och 1×10^{-3} M (VM7Luc ER TA-test).

c) Siffran i _{nom} parentes motsvarar antalet testresultat som klassificerats som positiva (POS) eller negativa (NEG) i det totala antalet referensstudier.

1 Värden rapporterade i *Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity – The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line* (2)

2 ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: *An In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists* (3)

3 EC50-medelvärdena beräknades med hjälp av värden som rapporterats från de laboratorier som deltog i VM7Luc ER TA-valideringsstudien (XDS, ECVAM och Hiyoshi) (3).

4 Klassificeringen som ER-agonister eller som negativa grundades på information i ICCVAM:s bakgrundsdokument om analyser av östrogenreceptorbindning och transaktivering (31) samt på information från publikationer som offentliggjorts och granskats efter slutförandet av ICCVAM:s bakgrundsdokument (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Anmärkningar: Alla tester inom denna testmetod omfattar inte samma mätningar. I vissa situationer kan inte EC₅₀ beräknas eftersom det inte skapas en fullständig dosresponskurva. I STTA-testet är PC10-värdet ett nyckelmått, men det kan även finnas andra exempel där en PC_x ger användbar information.

Tabell 2: Jämförelse mellan resultaten från STTA- och VM7Luc ER TA-testerna för ämnen som testats i båda antagonisttesterna och klassificerats som ER-antagonister (POS) eller som negativa (NEG)

	Ämne ^a	CAS-nr	ER STTA-test ¹		VM7Luc ER TA-test ²		ER STTA kandidat-effekter ⁴	ICCVAM ⁵ Överenskommen klassificering	MeSH ⁶ Kemisk klass	Produktklass ⁷
			ER TA Aktivitet	IC ₅₀ -värde ^b (M)	ER TA Aktivitet	IC ₅₀ -värde ^{b,3} (M)				
1	4-hydroxitamoxifen	68047-06-3	POS	$3,97 \times 10^{-9}$	POS	$2,08 \times 10^{-7}$	måttligt POS	POS	Kolväte (cykliskt)	Läkemedel
2	Dibenz[a,h]antracen	53-70-3	POS	Ej IC ₅₀	POS	Ej IC ₅₀	POS	PP	Polycykliska kolväten	Laboratoriekemikalie, naturprodukt
3	Mifepriston	84371-65-3	POS	$5,61 \times 10^{-6}$	NEG	-	svagt POS	NEG	Steroid	Läkemedel
4	Raloxifen HCl	82640-04-8	POS	$7,86 \times 10^{-10}$	POS	$1,19 \times 10^{-9}$	måttligt POS	POS	Kolväte (cykliskt)	Läkemedel
5	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	POS	$8,17 \times 10^{-7}$	POS	POS	Kolväte (cykliskt)	Läkemedel
6	17β-östradiol	50-28-2	NEG	-	NEG	-	PN	PN	Steroid	Läkemedel, veterinärmedicin
7	Apigenin	520-36-5	NEG	-	NEG	-	NEG	NEG	Heterocyklisk förening	Färg, naturprodukt, farmaceutisk mellanprodukt
8	Atrazin	1912-24-9	NEG	-	NEG	-	NEG	PN	Heterocyklisk förening	Herbicide
9	Dibutylftalat	84-74-2	NEG	-	NEG	-	NEG	NEG	Ester, ftalsyra	Ingrediens i kosmetika, industrikemikalie, mjukningsmedel
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	-	NEG	-	ej testat	PN	Heterocyklisk förening, pyrimidin	Svampmedel
11	Flavon	525-82-6	NEG	-	NEG	-	PN	PN	Flavonoid, heterocyklisk förening	Naturprodukt, läkemedel
12	Flutamid	13311-84-7	NEG	-	NEG	-	NEG	PN	Amid	Läkemedel, veterinärmedicin
13	Genistein	446-72-0	NEG	-	NEG	-	PN	NEG	Flavonoid, heterocyklisk förening	Naturprodukt, läkemedel
14	p-n-nonylfenol	104-40-5	NEG	-	NEG	-	ej testat	NEG	Fenol	Kemisk mellanprodukt
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	-	NEG	-	PN	NEG	Kolväte (cykliskt)	Naturprodukt

Förkortningar: CAS-nr = Chemical Abstracts Service Registry Number. M = molar. IC₅₀ = halva den maximala hämmande koncentrationen av testämnet. NEG = negativ. PN = förmodat negativ. POS = positiv. PP = förmodat positiv.

^a Vanliga ämnen som testas i STTA- och VM7Luc ER TA-testerna och har benämnts som ER-antagonister eller negativa. De används för att utvärdera noggrannheten i valideringsstudien för VM7Luc ER TA (2) (3).

^b Högsta koncentration som testats i avsaknad av begränsningar på grund av cytotoxicitet eller olöslighet var 1×10^{-3} M (STTA-test) och 1×10^{-5} M (VM7Luc ER TA-test).

¹ Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2)

² ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

³ IC₅₀-medelvärdena beräknades med hjälp av värden som rapporterats från de laboratorier som deltog i VM7Luc ER TA-valideringsstudien (XDS, ECVAM och Hiyoshi) (3).

⁴ Förmodad ER STTA-aktivitet utifrån rapporterade effekter, kända från CERI:s historiska data från testet av östrogenreceptorers bindning, det uterotrofa testet och information från den öppna litteraturen (2)

⁵ Klassificeringen av ER-antagonister som positiva eller negativa grundades på information i ICCVAM:s bakgrundsdokument om tester av östrogenreceptorbindning och transaktivering (31) samt på information från publikationer som publicerats och granskats efter slutförandet av ICCVAM:s bakgrundsdokument (2) (3) (18) (31).

⁶ Ämnen placerades i en eller flera kemiska klasser med användning av U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), ett internationellt erkänt standardiserat klassificeringssystem (se <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁷ Ämnen placerades i en eller flera produktklasser med användning av databanken U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (se <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

KOMPONENTER I ER TA-TESTET

Huvudsakliga testkomponenter

11. Denna testmetod är tillämplig på tester som använder en stabilt transfekterad eller endogen ER α -receptor och en stabilt transfekterad rapportgen, under kontroll av ett eller flera östrogenresponselement. Andra receptorer såsom ER β kan dock förekomma. De är de huvudsakliga testkomponenterna.

Kontroller

12. Grunden för de föreslagna parallella referensstandarderna för varje typ av agonist- och antagonisttest bör beskrivas. Relevanta parallella kontroller (negativ, lösningsmedel och positiv) anger om testet fungerar under testbetingelserna och utgör underlag för jämförelser mellan försök. De ingår vanligen i acceptanskriterierna för ett visst försök (1).

Standardförfaranden för kvalitetskontroll

13. Standardförfaranden för kvalitetskontroll bör genomföras enligt beskrivningen för varje test för att säkerställa att cellinjen håller sig stabil under flera passager, förblir fri från mykoplasma (dvs. fri från bakterieinfektion) och behåller förmågan att ge den förväntade ER-medierade responsen över tiden. Cellinjerna bör kontrolleras närmare så att de har rätt identitet och inte innehåller andra föroreningar (t.ex. svamp, jäst och virus).

Demonstration av laboratoriets kompetens

14. Innan okända kemikalier testas i något av de tester som ingår i denna testmetod bör laboratorierna visa att de har kompetens att använda testet. För att visa kompetens bör varje laboratorium testa de 14 kvalifikationsämnen i tabell 3 för agonisttestet och de 10 kvalifikationsämnen i tabell 4 för antagonisttestet. Kompetenstestningen kommer även att bekräfta testsystemets respons. Förteckningen över kvalifikationsämnen är en delmängd av de referensämnen som anges i prestandastandarderna för ER TA-testerna (6). Ämnena finns kommersiellt tillgängliga, motsvarar de klasser av kemikalier som vanligen förknippas med agonistisk eller antagonistisk aktivitet hos östrogenreceptorer, visar ett lämpligt potensintervall som förväntas för östrogenreceptorers agonister/antagonister (dvs. stark till svag) och omfattar negativa resultat. Testningen av kvalifikationsämnen bör upprepas minst två gånger, på olika dagar. Kompetens visas genom en korrekt klassificering (positiv/negativ) av varje kvalifikationsämne. Kompetenstestning bör göras av varje tekniker som lär sig testmetoderna. Beroende på celltyp kan vissa av kvalifikationsämnena bete sig som selektiva östrogenreceptormodulatorer (SERM) och uppvisa aktivitet som både agonister och antagonister. I tabellerna 3 och 4 klassificeras kvalifikationsämnena dock efter sin kända dominerande aktivitet, och detta bör användas i kompetensbedömningen.
15. För att visa prestanda och för kvalitetskontrolländamål bör laboratorierna sammanställa historiska databaser över data om agonister och antagonister med en referensstandard (t.ex. 17 β -östradiol och tamoxifen), positiva och negativa kontrollkemikalier och

lösningsmedelskontroll (t.ex. DMSO). Som utgångspunkt bör databasen skapas utifrån minst tio oberoende testomgångar med agonister (t.ex. 17β -östradiol) och tio oberoende testomgångar med antagonister (t.ex. tamoxifen). Resultaten från framtida tester av dessa referensstandarder och lösningsmedelskontroller bör läggas in i databasen så att den utökas för att säkerställa konsekvens och prestanda för det biologiska testet vid laboratoriet över tiden.

Tabell 3: Förteckning över (14) kvalifikationsämnen för agonisttest⁸

Nr ⁷	Ämne	CAS-nr	Förväntad respons ¹	STTA-test			VM7Luc ER TA-test		Kemisk klass i MeSH ⁵	Produktklass ⁶
				PC ₁₀ -värde (M) ²	PC ₅₀ -värde (M) ²	Testkonc.intervall (M)	VM7Luc EC ₅₀ -värde (M) ³	Högsta konc. för förberedande koncentrationsintervalltest (M) ⁴		
14	Diethylstilbestrol	56-53-1	POS	<1,00 × 10 ⁻¹¹	2,04 × 10 ⁻¹¹	10-14 – 10-8	3,34 × 10 ⁻¹¹	3,73 × 10 ⁻⁴	Kolväte (cykliskt)	Läkemedel, veterinärmedicin
12	17α-östradiol	57-91-0	POS	4,27 × 10 ⁻¹¹	6,44 × 10 ⁻¹⁰	10-11 – 10-5	1,40 × 10 ⁻⁹	3,67 × 10 ⁻³	Steroid	Läkemedel, veterinärmedicin
15	meso-hexestrol	84-16-2	POS	<1,00 × 10 ⁻¹¹	2,75 × 10 ⁻¹¹	10-11 – 10-5	1,65 × 10 ⁻¹¹	3,70 × 10 ⁻³	Kolväte (cykliskt), fenol	Läkemedel, veterinärmedicin
11	4-tert-oktylfenol	140-66-9	POS	1,85 × 10 ⁻⁹	7,37 × 10 ⁻⁸	10-11 – 10-5	3,19 × 10 ⁻⁸	4,85 × 10 ⁻³	Fenol	Kemisk mellanprodukt
9	Genistein	446-72-0	POS	2,24 × 10 ⁻⁹	2,45 × 10 ⁻⁸	10-11 – 10-5	2,71 × 10 ⁻⁷	3,70 × 10 ⁻⁴	Flavonoid, heterocyklisk förening	Naturprodukt, läkemedel
6	Bisfenol A	80-05-7	POS	2,02 × 10 ⁻⁸	2,94 × 10 ⁻⁷	10-11 – 10-5	5,33 × 10 ⁻⁷	4,38 × 10 ⁻³	Fenol	Kemisk mellanprodukt
2	Kaempferol	520-18-3	POS	1,36 × 10 ⁻⁷	1,21 × 10 ⁻⁶	10-11 – 10-5	3,99 × 10 ⁻⁶	3,49 × 10 ⁻³	Flavonoid, heterocyklisk förening	Naturprodukt
3	Bensylbutylftalat	85-68-7	POS	1,14 × 10 ⁻⁶	4,11 × 10 ⁻⁶	10-11 – 10-5	1,98 × 10 ⁻⁶	3,20 × 10 ⁻⁴	Karboxylsyra, ester, ftalsyra	Mjukningsmedel, industrikemikalie
4	p,p'-metoxiklor	72-43-5	POS	1,23 × 10 ⁻⁶	-	10-11 – 10-5	1,92 × 10 ⁻⁶	2,89 × 10 ⁻³	Kolväte (halogenerat)	Bekämpningsmedel, veterinärmedicin
1	Etylparaben	120-47-8	POS	5,00 × 10 ⁻⁶	-	10-11 – 10-5	2,48 × 10 ⁻⁵	6,02 × 10 ⁻³	Karboxylsyra, fenol	Läkemedel, konserveringsmedel
17	Atrazin	1912-24-9	NEG	-	-	10-10–10-4	-	4,64 × 10 ⁻⁴	Heterocyklisk förening	Herbicide
20	Spironolakton	52-01-7	NEG	-	-	10-11 – 10-5	-	2,40 × 10 ⁻³	Lakton, steroid	Läkemedel
21	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	-	-	10-11 – 10-5	-	9,41 × 10 ⁻⁵	Heterocyklisk förening	Läkemedel
22	Reserpin	50-55-5	NEG	-	-	10-11 – 10-5	-	1,64 × 10 ⁻³	Heterocyklisk förening, indol	Läkemedel, veterinärmedicin

Förkortningar: CAS-nr = Chemical Abstracts Service Registry Number. EC50 = halva den maximala effektiva koncentrationen av testämnet. NEG = negativ. POS = positiv. PC10 (och PC50) = koncentration av ett testämne vid vilken responsen är 10 % (eller 50 % för PC50) av den respons som orsakas av den positiva kontrollen (E2, 1nM) i varje platta.

- ¹ Klassificeringen av ER-antagonisters aktivitet som positiv eller negativ grundades på ICCVAM:s bakgrundsdokument om test av östrogenreceptorbindning och transaktivering (31) samt på empiriska data och annan information från referensstudier som publicerats och granskats efter slutförandet av ICCVAM:s bakgrundsdokument. (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).
- ² Värden rapporterade i *Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity – The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line* (30)
- ³ EC50-medelvärdena beräknades med hjälp av värden som rapporterats från de laboratorier som deltog i VM7Luc ER TA-valideringsstudien (XDS, ECVAM och Hiyoshi) (3).
- ⁴ De rapporterade koncentrationerna var de högsta koncentrationer som testades (förberedande test) under valideringen av VM7Luc ER TA-testet. Om koncentrationen varierar mellan laboratorierna rapporteras den högsta koncentrationen. Se tabell 4-10 i *ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals* (3).
- ⁵ Ämnena placerades i en eller flera kemiska klasser med användning av U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), ett internationellt erkänt standardiserat klassificeringssystem (se <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).
- ⁶ Ämnena placerades i en eller flera produktklasser med användning av databanken U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (se <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>)
- ⁷ Från tabell 1 (förteckning över referenskemikalier (22) för utvärdering av noggrannhet hos östrogenreceptoragonister) i prestandastandarderna (6).
- ⁸ Om en kvalifikationskemikalie inte längre finns kommersiellt tillgänglig kan ett ämne som har samma klassificering och är jämförbart när det gäller potens, verkningsätt och kemisk klass användas.

Tabell 4: Förteckning över (10) kvalifikationsämnen för antagonisttest

	Ämne ^a	CAS-nr	ER STTA-test ¹			VM7Luc ER TA-test ²			ER STTA ¹ kandidateffekter	ICCVAM ⁵ Överenskommen klassificering	MeSH ⁶ Kemisk klass	Produktklass ⁷
			ER TA- aktivitet	IC ₅₀ (M)	Testkonc.intervall (M)	ER TA- aktivitet	IC ₅₀ ³ (M)	Högsta konc. för förberedande test (M) ⁴				
1	4-hydroxitamoxifen	68047-06-3	POS	$3,97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POS	$2,08 \times 10^{-7}$	$2,58 \times 10^{-4}$	måttligt POS	POS	Kolväte (cykliskt)	Läkemedel
2	Raloxifen HCl	82640-04-8	POS	$7,86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POS	$1,19 \times 10^{-7}$	$1,96 \times 10^{-4}$	måttligt POS	POS	Kolväte (cykliskt)	Läkemedel
3	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} - 10^{-5}$	POS	$8,17 \times 10^{-7}$	$2,69 \times 10^{-4}$	POS	POS	Kolväte (cykliskt)	Läkemedel
4	17β-östradiol	50-28-2	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$3,67 \times 10^{-3}$	förväntas vara negativ*	PN	Steroid	Läkemedel, veterinärmedicin
5	Apigenin	520-36-5	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$3,70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterocyklisk förening	Färg, naturprodukt, farmaceutisk mellanprodukt
6	Dibutylftalat	84-74-2	NEG	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	-	$3,59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Ester, ftalsyra	Ingrediens i kosmetika, industrikemikalie, mjukningsmedel
7	Flavon	525-82-6	NEG	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	-	$4,50 \times 10^{-4}$	förväntas vara negativ*	PN	Flavonoid, heterocyklisk förening	Naturprodukt, läkemedel
8	Genistein	446-72-0	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$3,70 \times 10^{-4}$	förväntas vara negativ*	NEG	Flavonoid, heterocyklisk förening	Naturprodukt, läkemedel
9	p-n-nonylfenol	104-40-5	NEG	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	-	$4,54 \times 10^{-4}$	ej testat	NEG	Fenol	Kemisk mellanprodukt
10	Resveratrol	501-36-0	NEG	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	-	$4,38 \times 10^{-4}$	förväntas vara negativ*	NEG	Kolväte (cykliskt)	Naturprodukt

Förkortningar: CAS-nr = Chemical Abstracts Service Registry Number. M = molar. IC₅₀ = halva den maximala hämmande koncentrationen av testämnet. NEG = negativ. PN = förmodat negativ. POS = positiv.

* Klassificerat som negativt enligt litteraturgranskning (2).

^a Vanliga ämnen som testas i STTA- och VM7Luc ER TA-testerna och har benämnts som ER-antagonister eller negativa. De används för att utvärdera noggrannheten i valideringsstudien för VM7Luc ER TA (2) (3).

¹ Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2)

² ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: *An In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists* (3).

³ IC₅₀-medelvärdena beräknades med hjälp av värden som rapporterats från de laboratorier som deltog i VM7Luc ER TA-valideringsstudien (XDS, ECVAM och Hiyoshi) (3).

⁴ De rapporterade koncentrationerna var de högsta koncentrationer som testades (förberedande test) under valideringen av VM7Luc ER TA-testet. Om koncentrationen varierar mellan laboratorerna rapporteras den högsta koncentrationen. Se tabell 4-11 i *ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals* (3).

⁵ Klassificeringen av ER-antagonister som positiva eller negativa grundades på information i ICCVAM:s bakgrundsdokument om analyser av östrogenreceptorbindning och transaktivering (31) samt på information från publikationer som publicerats och granskats efter slutförandet av ICCVAM:s bakgrundsdokument (2) (3) (18) (31).

⁶ Ämnena placerades i en eller flera kemiska klasser med användning av U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), ett internationellt erkänt standardiserat klassificeringssystem (se <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁷ Ämnena placerades i en eller flera produktklasser med användning av databanken U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (se <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

Acceptanskriterier för testomgång

16. Godkännandet eller förkastandet av en testomgång baseras på en utvärdering av de resultat som har erhållits för de referensstandarder och kontroller som använts för varje försök. Värdena för PC₅₀ (EC₅₀) eller IC₅₀ för referensstandarderna bör uppfylla acceptanskriterierna för det valda testet (se tillägg 2 för STTA och tillägg 3 för VM7Luc ER TA), och samtliga positiva/negativa kontroller bör klassificeras korrekt för varje godtagat försök. Laboratoriet bör visa att det har förmåga att utföra testet på ett konsekvent sätt genom att utveckla och underhålla en historisk databas för referensstandarderna och kontrollerna (se punkt 15). Standardavvikelser eller variationskoefficienter för medelvärden av parametrars anpassning till referensstandardkurvan erhållna från flera olika försök kan användas som ett mått på laboratoriets kunnighet att utföra testet. Dessutom bör följande principer för acceptanskriterierna vara uppfyllda:

- Laboratoriet bör förfoga över tillräckliga data för att kunna göra en kvantitativ bedömning av östrogenreceptorers aktivering (för agonisttest) eller undertryckning (för antagonisttest) dvs. effektivitet och potens.
- För att säkerställa tillräcklig sensitivitet bör rapportgenens genomsnittliga aktivitet för referenskoncentrationen av referensöstrogenet vara lägst det värde som anges i metoderna jämfört med vehikelkontrollen (lösningsmedelskontrollen). För STTA- och VM7Luc ER TA-testerna är detta fyra gånger medelvärdet för vehikelkontrollen på varje platta.
- De testade koncentrationerna bör hållas sig inom testkemikaliernas löslighetsintervall och bör inte uppvisa cytotoxicitet.

Analys av data

17. Det fastställda datatolkningsförfarandet för varje test bör användas för att klassificera positiv och negativ respons.
18. Om acceptanskriterierna uppfylls (punkt 16) innebär detta att testet fungerar korrekt, men det säkerställer inte att en viss testomgång kommer att ge korrekta data. En upprepning av resultaten från den första testomgången är den bästa indikationen på att korrekta data har erhållits. Om två testomgångar ger reproducerbara resultat (t.ex. resultaten från båda testomgångarna visar att en testkemikalie är positiv) är det inte nödvändigt att utföra en tredje testomgång.
19. Om två testomgångar inte ger reproducerbara resultat (t.ex. att en testkemikalie är positiv i en testomgång och negativ i nästa), eller om en högre precision krävs för resultatet av testet, bör minst tre oberoende testomgångar utföras. I ett sådant fall baseras klassificeringen på de två samstämmiga resultaten av de tre.

Allmänna datatolkningskriterier

20. Det finns för närvarande ingen allmänt överenskommen metod för att tolka ER TA-data. Både kvalitativa (t.ex. positiv/negativ) och/eller kvantitativa (t.ex. EC₅₀, PC₅₀, IC₅₀) bedömningar av ER-medierad aktivitet bör dock baseras på empiriska data och välgrundade vetenskapliga bedömningar. Om det är möjligt bör positiva resultat karakteriseras av både effektens omfattning jämfört med vehikelkontrollen (lösningsmedelskontrollen) eller referensöstroget och den koncentration vid vilken effekten inträffar (t.ex. en EC₅₀, PC₅₀, RPC_{Max}, IC₅₀ osv.).

Testrapport

21. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testmetod:

- Använd metod.
- Kontroll/referensstandard/testkemikalie.
- Källa, satsnummer, sista förbrukningsdag om detta anges.
- Testkemikalins stabilitet i sig, om den är känd.
- Löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet, om detta är känt.
- Mätning av pH, osmolalitet och fällningar i det odlingsmedium till vilket testkemikalien tillsattes, i förekommande fall.

Monokomponentämne:

- fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,
- kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.

Multikomponentämne, UVCB-ämnena och blandningar:

- karakteriseras så långt som möjligt genom kemikalieidentifiering (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.

Lösningsmedel/vehikel:

- Karakterisering (form, leverantör och parti).
- Motivering av valet av lösningsmedel/vehikel.
- Löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt.

Celler:

- Typ av celler och deras källa.

- Har östrogenreceptorn ett endogent uttryck? Om så inte är fallet, vilken eller vilka receptorer transfekterades?
 - Använd(a) rapportgen(er) (inklusive källarter).
 - Transfektionsmetod.
 - Urvalsmetod för upprätthållande av stabil transfektion (i förekommande fall).
 - Är transfektionsmetoden relevant för stabila linjer?
- Antal cellpassager (från upptining).
 - Antal passager för celler vid upptining.
 - Metoder för underhåll av cellodlingar.

Testbetingelser:

- Löslighetsbegränsningar.
- Beskrivning av använda metoder för viabilitetsbedömning.
- Mediernas sammansättning, CO₂-koncentration.
- Testkemikaliens koncentrationer.
- Den tillsatta vehikelns och testkemikaliens volym.
- Inkubationstemperatur och luftfuktighet.
- Behandlingens varaktighet.
- Celltäthet i början av och under behandlingen.
- Positiva och negativa referensstandarder.
- Rapportgenreagenser (produktnamn, leverantör och partinummer).
- Kriterier för när testomgångar ska anses som positiva, negativa eller tvetydiga.

Acceptansk kontroll:

- Induktionsförhållande för varje testplatta och om de uppfyller det minimum som krävs enligt testmetoden baserat på historiska kontroller.
- Faktiska värden för acceptanskriterier, t.ex. log₁₀EC₅₀, log₁₀PC₅₀, logIC₅₀ och Hill-koefficient (Hillslope) för parallella positiva kontroller/referensstandarder.

Resultat:

- Rådata och normaliserade data.
- Maximalt induktionsförhållande.

- Cytotoxicitetsdata.
- I förekommande fall, lägsta effektiva koncentration (LEC).
- Värden för RPC_{Max} , PC_{Max} , PC_{50} , IC_{50} och/eller EC_{50} , i förekommande fall.
- Koncentration-responsförhållande, där det är möjligt.
- Eventuella statistiska analyser, tillsammans med fel- och konfidensmätning (t.ex. SEM, SD, CV eller 95 % CI) samt en beskrivning av hur dessa värden erhöles.

Diskussion av resultaten.

Slutsats

LITTERATUR

- (1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 34), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (2) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 225), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- (4) Pujol P., et al.(1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer. Res.*, 58(23): s. 5367–5373.
- (5) Rogers J.M. och Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research*, 13(1): s. 67–82.
- (6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 173), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 174), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (8) OECD (2012). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 150), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

- (9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. *Climacteric*, 5 Suppl 2: s. 20–26.
- (10) Welboren W.J. et al. (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer*, 16(4): s. 1073–1089.
- (11) Younes M. och Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): s. 63–66.
- (12) Jefferson W.N., et al. (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, *Journal of Chromatography B*, 777(1–2): s. 179–189.
- (13) Sonneveld E., et al. (2006). Comparison of *In Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol. Sci.*, 89(1): s. 173–187.
- (14) Takeyoshi M., et al. (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, *Toxicology Letters*, 126(2): s. 91–98.
- (15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 28(1): s. 81–118.
- (16) Escande A., et al. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71(10): s. 1459–1469.
- (17) Gray, L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol. Lett.*, 102–103, 677–680.
- (18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.
- (19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor β – A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, *Journal of Endocrinology*, 163(3): s. 379–383.
- (21) Ogawa S. et al. (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor β (hER β) and its Heterodimerization with ER α *In Vivo* and *In Vitro*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243(1): s. 122–126.

- (22) Enmark E. et al. (1997). Human Estrogen Receptor β -Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(12): s. 4258–4265.
- (23) Ball L.J. et al. (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 299(2): s. 204–211.
- (24) Barkhem T. et al. (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, *Mol. Pharmacol*, 54(1): s. 105–112.
- (25) Deroo B.J. och Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor- β : Mechanistic Insights from Recent Studies, *Molecular Endocrinology*, 24(9): s. 1703–1714.
- (26) Harris D.M. et al. (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, *Experimental Biology and Medicine*, 230(8): s. 558–568.
- (27) Anderson J.N. Clark J.H. och Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 48(6): s. 1460–1468.
- (28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, *Journal of Steroid Biochemistry*, 3(3): s. 515–522.
- (29) Gorski J. et al. (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, *Recent Progress in Hormone Research*, 24: s. 45–80.
- (30) Jensen E.V., et al. (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale*, 56(3): s. s. 547–569.
- (31) ICCVAM (2002). Background review document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (nr 03-4505.).
- (32) Kanno J. et al. (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, *Environ. Health Persp.*, 109:785–794.
- (33) Kanno J., et al. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Dose Response Studies. *Health Persp.*, 111:1530–1549.

- (34) Kanno J., et al. (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1550–1558.
- (35) Geisinger, et al. (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280–288.
- (36) Baldwin, et al. (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649–654.
- (37) Li, Y., et al. (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, *Mol. Endo.* 28, s. 2072–2081.
- (38) Rogers, J.M. och Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, s. 67–82.

Tillägg 1

DEFINITIONER OCH FÖRKORTNINGAR

Acceptanskriterier: minimistandarder för försökskontrollers och referensstandarders prestanda. Samtliga acceptanskriterier ska vara uppfyllda för att ett försök ska anses vara giltigt.

Noggrannhet (konkordans): anger hur väl testresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Det är ett mått på testmetodens prestanda och relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med "konkordans" för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (1).

Agonist: ett ämne som producerar en respons, t.ex. transkription, när det binds till en viss receptor.

Antagonist: en typ av receptorligand eller kemikalie som i sig inte utlöser en biologisk respons när den binds till en receptor, utan blockerar eller hämmar agonistmedierad respons.

Antiöstrogen aktivitet: en kemikalies förmåga att undertrycka aktiviteten hos en 17 β -östradiol som medieras genom östrogenreceptorer.

Cellmorfologi: form och utseende hos en cell som odlats i ett monolager i ett enda hål i en vävnadodlingsplatta. Celler som håller på att torka uppvisar ofta en onormal cellmorfologi.

CF: OECD:s ramverk för testning och bedömning av hormonstörande ämnen (OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters).

Träkols-/dextranbehandling: behandling av serum som används i en cellodling. Behandling med trækol/dextran (ofta benämnd "strippning") eliminerar endogena hormoner och hormonbindande proteiner.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Cytotoxicitet: skadliga effekter på cellens struktur eller funktion som i slutändan kan leda till celldöd. Cytotoxicitet kan avspeglas genom ett minskat antal celler i hålet i slutet av exponeringsperioden eller genom minskad kapacitet att mäta cellfunktionen jämfört med den parallella vehikelkontrollen.

CV: Variationskoefficient.

DCC-FBS: dextranbelagt trækolsbehandlat fetalt bovins serum.

DMEM: Dulbecco's Modification of Eagle's Medium.

DMSO: Dimetylsulfoxid.

E2: 17 β -östradiol.

EC₅₀: halva den maximala effektiva koncentrationen av testkemikalien.

ED. hormonstörning.

hER α : human östrogenreceptor alfa.

hER β : human östrogenreceptor beta.

EFM: östrogenfritt medium. Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM), kompletterat med 4,5 % tråkols-/dextranbehandlat fetalt bovins serum (FBS), 1,9 % L-glutamin och 0,9 % Pen-Strep.

ER östrogenreceptor.

ERE: östrogenreceptorelement.

Östrogen aktivitet: en kemikalies förmåga att imitera 17 β -östradiol i dess förmåga att binda sig till och aktivera östrogenreceptorer. Det är möjligt att detektera hER α -medierad östrogen aktivitet med hjälp av denna metod.

ERTA: transaktivering av östrogenreceptor.

FBS: fetalt bovins serum.

HeLa: en odödlig human cervikal cellinje.

HeLa9903: en subklon av en HeLa-cell, i vilken hER α och en luciferasrapportgen har transfekterats stabilt.

IC₅₀: halva den maximala effektiva koncentrationen av en hämmande testkemikalie.

ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods.

Reproducerbarhet mellan laboratorier: ett mått på i hur stor utsträckning olika kvalificerade laboratorier kan producera kvalitativt och kvantitativt liknande resultat, med användning av samma protokoll och testning av samma ämnen. Reproducerbarheten mellan laboratorier fastställs under förvalideringen och valideringen och den indikerar i hur stor utsträckning en testmetod framgångsrikt kan överföras mellan laboratorier (1).

Reproducerbarhet inom laboratoriet: ett mått på i vilken utsträckning kvalificerade personer inom samma laboratorium framgångsrikt kan upprepa resultat vid olika tidpunkter när de använder ett visst protokoll. (1).

LEC: lägsta effektiva koncentration är den lägsta koncentration av testkemikalien som producerar en respons (dvs. den lägsta kemiska koncentrationen vid vilken induktionsförhållandet statistiskt skiljer sig från den parallella vehikelkontrollen).

Me too-test: ett vardagligt uttryck för en testmetod som strukturellt och funktionellt liknar en validerad och godtagen referenstestmetod. Kallas även "liknande testmetod" (14).

MT: metallotionein.

MMTV: Mouse Mammary Tumor Virus.

OHT: 4-hydroxitamoxifen

PBTG: prestandabaserad testriktlinje.

PC (positiv kontroll): ett ämne med stark aktivitet, företrädesvis 17 β -östradiol, som inkluderas i alla tester för att bidra till att säkerställa att testet fungerar korrekt.

PC₁₀: den koncentration av en testkemikalie vid vilken den mätta aktiviteten i ett agonisttest utgör 10 % av den maximala effektivitet som inducerats av den positiva kontrollen (E2 vid 1nM för STTA-testet) i varje platta.

PC₅₀: den koncentration av en testkemikalie vid vilken den mätta aktiviteten i ett agonisttest utgör 50 % av den maximala effektivitet som inducerats av den positiva kontrollen (E2 vid den referenskoncentration som anges i testmetoden) i varje platta.

PC_{Max}: den koncentration av testkemikalien som inducerar RPC_{Max}.

Prestandastandarder: standarder som baseras på en validerad testmetod och som utgör grunden för utvärdering av jämförbarheten för en föreslagen testmetod som är mekaniskt och funktionellt likartad. Dessa standarder omfattar 1) grundläggande testkomponenter, 2) en minimiförteckning med referenskemikalier som valts ut från de kemikalier som använts för att visa att den validerade metoden fungerar tillfredsställande, och 3) de jämförbara nivåer av noggrannhet och tillförlitlighet, på grundval av vad som erhållits för den validerade testmetoden, som man bör kunna påvisa för den föreslagna testmetoden när den utvärderas med användning av minimiförteckningen med referenskemikalier (1).

Kvalifikationsämnen: en delmängd av de referensämnen som anges i prestandastandarderna, och som laboratorierna kan använda för att visa teknisk kompetens med en standardiserad testmetod. Typiska urvalskriterier för dessa ämnen är att de representerar responsintervallet, finns kommersiellt tillgängliga och att det finns tillgängliga referensdata av hög kvalitet.

Kompetens: Visad förmåga att utföra en testmetod korrekt innan okända ämnen testas.

Referensöstrogen (positiv kontroll, PC): 17 β -östradiol (E2, CAS-nr 50-28-2).

Referensstandard: ett referensämne som används för att visa att en testmetod är lämplig. 17 β -östradiol är referensstandard för STTA- och VM7Luc ERTA-testerna.

Referenstestmetoder: De testmetoder som PBTG 455 är baserad på.

Relevans: beskrivning av förhållandet mellan testmetoden och den berörda effekten och

huruvida detta förhållande är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl man genom testet korrekt kan mäta och förutse den biologiska effekt det gäller. Den inkluderar också överväganden om noggrannheten (konkordans) hos en testmetod (1).

Tillförlitlighet: mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när den utförs med hjälp av samma protokoll. Den bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier.

RLU: relativa ljusenheter.

RNA: ribonukleinsyra.

RPC_{Max}: maximal responsnivå som induceras av en testkemikalie, uttryckt som en procentenhet av den respons som 1 nM E2 inducerar på samma platta.

RPMI: RPMI 1640-medium, kompletterat med 0,9 % Pen-Strep och 8,0 % fetalt bovinserum (FBS).

Testomgång: ett enskilt försök där den kemiska aktiviteten utvärderas i förhållande till testets biologiska utfall. Varje testomgång utgör ett fullständigt försök som utförs på replikathål med celler som samtidigt överförs till platta från en gemensam cellpool.

Oberoende testomgång: ett separat, oberoende försök där man utvärderar den kemiska aktivitetens inverkan på testets biologiska utfall, med användning av celler från en annan pool och nyligen utspädda kemikalier, som utförts på olika dagar eller på samma dag av olika personer.

SD: standardavvikelse.

Sensitivitet: den andel av alla positiva/aktiva ämnen som klassificeras korrekt i testet. Det är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (1).

Specifitet: den andel av alla negativa/inaktiva ämnen som klassificeras korrekt i testet. Det är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (1).

Stabil transfektion: när DNA transfekteras in i odlade celler på ett sådant sätt att det stabilt integreras i cellens genom, vilket leder till ett stabilt uttryck av transfekterade gener. Kloner av stabilt transfekterade celler väljs med hjälp av stabila markörer (t.ex. motståndsförmåga mot G418).

STTA-test: *Stably Transfected Transactivation Assay*, ER α transkriptionell aktivering med användning av cellinjen HeLa 9903.

Studie: hela det försöksarbete som utförs för att utvärdera ett enskilt specifikt ämne med användning av en viss testmetod. En studie omfattar samtliga steg, inklusive test av utspädning

av testkemikalien i testmediet, förberedande test för att bestämma koncentrationsintervall, alla nödvändiga fullständiga testomgångar, dataanalyser, kvalitetssäkring, cytotoxicitetsbedömningar osv. När studien är slutförd är det möjligt att klassificera den använda testkemikaliens aktivitet på toxicitetsmålet (dvs. aktiv, inaktiv eller obestämdd) och göra en uppskattning av den positiva referenskemikaliens potens.

Ämne: enligt Reachförordningen¹² definieras ett ämne som ett kemiskt grundämne och föreningar av detta grundämne i naturlig eller tillverkad form, inklusive de eventuella tillsatser som är nödvändiga för att bevara dess stabilitet och sådana föroreningar som härrör från tillverkningsprocessen, men exklusive eventuella lösningsmedel som kan avskiljas utan att det påverkar ämnets stabilitet eller ändrar dess sammansättning. En mycket liknande definition används i GHS (1).

TA (transaktivering): inledandet av mRNA-syntesen till svar på en specifik kemisk signal, såsom bindning av ett östrogen till östrogenreceptorn.

Test: inom ramen för denna testmetod är test en av de metoder som är giltiga för att uppfylla de fastställda prestandakriterierna. Komponenter i ett test är exempelvis den specifika cellinjen och dess tillväxtförhållanden, det specifika medium som testet utförs i, förhållanden för beredning av plattor, rutiner för och utspädning av testkemikalier samt eventuella andra nödvändiga kvalitetskontrollåtgärder och relaterade datautvärderingssteg.

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

Transkription: mRNA-syntes.

UVCB-ämne: kemiska substanser av okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter och biologiskt material.

Validerad testmetod: en testmetod för vilken valideringsstudier har genomförts för att fastställa relevans (inbegripet noggrannhet) och tillförlitlighet för ett specifikt ändamål. Det är viktigt att notera att en validerad testmetod kanske inte är tillräckligt noggrann och tillförlitlig när det gäller ett visst föreslaget ändamål (1).

Validering: den process genom vilken tillförlitligheten och relevansen hos en viss strategi, metod, testmetod, process eller bedömning fastställs för ett angivet syfte (1).

¹² 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 304, 22.11.2007, s. 1).

VC (vehikelkontroll): det lösningsmedel som används för att lösa upp test- och kontrollkemikalierna och som testas ensamt som vehikel, utan den upplösta kemikalien.

VM7: en odödlig adenokarcinomcell som endogent uttrycker östrogenreceptorn.

VM7Luc4E2: Cellinjen VM7Luc4E2 härleddes från VM7, immortaliserade humana adenokarcinomceller som endogent uttrycker båda formerna av östrogenreceptorn (ER α och ER β), och har transfekterats stabilt med plasmiden pGudLuc7.ERE. Denna plasmid innehåller fyra kopior av en syntetisk oligonukleotid, som i sin tur innehåller östrogenreceptorelementet uppströms från MMTV-promotorn och firefly-luciferas-genen.

Svag positiv kontroll: ett ämne med svag aktivitet som valts från förteckningen över referenskemikalier och inkluderas i alla tester för att bidra till att säkerställa att testmetoden fungerar korrekt.

Tillägg 2

STABILT TRANSFEKTERAD HUMAN ÖSTROGENRECEPTOR-A – TRANSAKTIVERINGSTEST FÖR DETEKTION AV ÖSTROGENAGONISTISK OCH - ANTAGONISTISK AKTIVITET HOS KEMIKALIER MED ANVÄNDNING AV CELLINJEN HERA-HELA-9903

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR (SE ÄVEN ALLMÄN INLEDNING)

1. Detta transaktiveringstest (TA) använder cellinjen hER α -HeLa-9903 för att detektera östrogenagonistisk aktivitet, medierad genom human östrogenreceptor alfa (hER α). Valideringsstudien för stabilt transfekterad transaktivering (*Stably Transfected Transactivation*) (STTA), som utförts av CERI (Japanese Chemicals Evaluation and Research Institute) med användning av cellinjen hER α -HeLa-9903 för att detektera östrogenagonistisk och antagonistisk aktivitet medierad genom human östrogenreceptor alfa, visade att testmetoden är relevant och tillförlitlig för det avsedda syftet (1).
2. Denna testmetod är särskilt utformad för att detektera hER α -medierad transaktivering genom att mäta kemiluminiscens som endpoint. Ej receptormedierade luminiscenssignaler har dock rapporterats vid fytoöstrogenkoncentrationer högre än 1 μ M till följd av överaktivering av luciferasrapportgenen (2) (3). Dosresponskurvan visar att den faktiska aktiveringen av östrogenreceptorsystemet inträffar vid lägre koncentrationer, men det luciferasuttryck som erhålls vid höga koncentrationer av fytoöstrogener eller liknande föreningar som misstänks producera fytoöstrogenlik överaktivering av luciferasrapportgenen, måste undersökas noggrant i stabilt transfekterade ER TA-testsystem (tillägg 1).
3. Avsnitten ”Allmän inledning” och ”Komponenter i ER TA-testet” bör läsas innan denna testmetod används för lagstadgade ändamål. Definitioner och förkortningar som används i denna testriktlinje beskrivs i tillägg 2.1.

PRINCIPER FÖR METODEN (SE ÄVEN ALLMÄN INLEDNING)

4. Denna testmetod används för att signalera östrogenreceptorns bindning med en ligand. Efter ligandbindning translokerar receptor–ligand-komplexet till kärnan, där det binder specifika DNA-responselement och transaktiverar en firefly-luciferasrapportgen, vilket leder till ökat celluttryck av luciferasenzym. Luciferin är ett substrat som luciferasenzymet omvandlar till en bioluminescent produkt som kan mätas kvantitativt med en luminometer. Luciferasaktivitet kan utvärderas snabbt och till låg kostnad med ett antal kommersiellt tillgängliga testkit.
5. Testsystemet använder cellinjen hER α -HeLa-9903, som härleds från en human cervikal tumör, med två stabilt infogade konstruktioner: i) Konstruktionen med hER α -uttryck (som kodar för hela den humana receptorn), och ii) en konstruktion med en firefly-luciferas-rapportgen som

bär fem tandemupprepningar av ett vitellogenin-östrogenreceptivt element (ERE), som drivs av ett MT-promotor (metallotionein) TATA-element från möss. MT TATA-genkonstruktionen från möss har visat bäst resultat, och används därför utbrett. Denna hER α -HeLa-9903-cellinje kan således mäta en testkemikalies förmåga att inducera hER α -medierad transaktivering från luciferasgenuttrycket.

6. I ER-agonisttestet baseras datatolkningen på huruvida den maximala responsnivå som induceras av en agonistrespons motsvarar eller överskrider 10 % av den respons som induceras genom en maximalt inducerande koncentration (1 nM) av den positiva kontrollen (PC) 17 β -östradiol (E2) (dvs. PC₁₀). I ER-antagonisttestet baseras datatolkningen på huruvida responsen visar en minskning på minst 30 % i aktiviteten från den respons som induceras genom den spikade kontrollen (25 pM E2) utan cytotoxicitet. Dataanalys och tolkning diskuteras i detalj i punkterna 34–48.

FÖRFARANDE

Cellinjer

7. Den stabilt transfekterade cellinjen hER α -HeLa-9903 bör användas i testet. Denna cellinje kan erhållas från cellbanken JRCB (Japanese Collection of Research Bioresources)¹³ genom att man ingår ett materialöverföringsavtal (MTA).
8. Endast celler som karakteriseras som mykoplasmafria bör användas i testningen. RT-PCR (*Real Time Polymerase Chain Reaktion*) är den valda metoden för en känslig detektion av mykoplasmainfektion (4) (5) (6).

Cellinjens stabilitet

9. För att övervaka cellinjens stabilitet bör E2, 17 α -östradiol, 17 α -metyltestosteron och kortikosteron användas som referensstandarder för agonisttest. En fullständig koncentrationsresponskurva i det testkoncentrationsintervall som anges i tabell 1 bör mätas minst en gång varje gång testet utförs, och resultaten bör överensstämja med de resultat som anges i tabell 1.
10. Vad beträffar antagonisttest bör två fullständiga koncentrationskurvor för två referensstandarder, tamoxifen och flutamid, mätas samtidigt med varje testomgång. Det är viktigt att övervaka en korrekt kvalitativ klassificering som positiv eller negativ för de två kemikalierna.

¹³ JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan, fax +81-72-641-9812.

Betingelser för cellodling och överföring till platta

11. Cellerna bör förvaras i EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) utan fenolrött, kompletterat med 60 mg/l antibiotiskt kanamycin och 10 % dextranbelagt tråkölsbehandlat fetalt bovins serum (DCC-FBS), i en CO₂-inkubator (5 % CO₂) vid 37±1°C. När cellerna når 75–90 % konfluens kan de subkultiveras vid 10 ml av 0,4 x 10⁵ – 1 x 10⁵ celler/ml för en cellodlingsskål på 100 mm. Cellerna bör suspenderas med 10 % FBS-EMEM (som är detsamma som EMEM med DCC-FBS) och sedan överförs till hål på en mikrotiterplatta vid en densitet på 1 x 10⁴ celler/(100 µl x hål). Därefter bör cellerna förinkuberas i en 5 % CO₂-inkubator vid 37 ± 1 °C i tre timmar före kemisk exponering. Plastvaran bör vara fri från östrogenaktivitet.
12. För att bibehålla responsens integritet bör cellerna odlas mer än en passage från den frysta stamodlingen i det konditionerade mediet, men bör inte odlas mer än 40 passager. För cellinjen hERα-HeLa-9903 kommer detta att ta mindre än tre månader. Cellernas prestanda kan dock minskas om de odlas under olämpliga odlingsförhållanden.
13. DCC-FBS kan beredas enligt beskrivningen i tillägg 2.2, eller erhållas från kommersiella källor.

Acceptanskriterier

Positiva och negativa referensstandarder för ER-agonisttest

14. Före och under studien bör testsystemets responsförmåga kontrolleras med hjälp av lämpliga koncentrationer av en stark östrogen (E2), en svag östrogen (17α-östradiol), en mycket svag agonist (17α-metyltestosteron) och en negativ substans (kortikosteron). Godtagbara intervallvärden som härletts från valideringsstudien (1) anges i tabell 1. Dessa fyra parallella referensstandarder bör ingå i varje försök och resultaten bör falla inom de givna godtagbara gränserna. Om så inte är fallet bör man fastställa orsaken till att acceptanskriterierna inte har uppfyllts (t.ex. hantering av cellerna, serum och antibiotika för kvalitet och koncentration), och därefter upprepa testet. När acceptanskriterierna har uppfyllts är det viktigt att cellodlingsmaterialet används på ett konsekvent sätt för att säkerställa minimal variation av värdena för EC₅₀, PC₅₀ och PC₁₀. De fyra parallella referensstandarderna, som bör ingå i varje försök (som utförs under samma förhållanden, inklusive material, cellernas passagenivå och av samma tekniker), kan säkerställa testets sensitivitet, eftersom PC₁₀ från de tre positiva referensstandarderna bör falla inom ett godtagbart intervall, vilket även gäller PC₅₀ och EC₅₀ om de kan beräknas (se tabell 1).

Tabell 1: Godtagbara intervallvärden för de fyra referensstandarderna för ER-agonisttestet

Namn	logPC ₅₀	logPC ₁₀	logEC ₅₀	Hillslope	Testintervall
17β-östradiol (E2) CAS-nr: 50-28-2	-11,4~10,1	< - 11	-11,3~10,1	0,7~1,5	10 ⁻¹⁴ ~10 ⁻⁸ M
17α-östradiol	-9,6~8,1	-10,7~9,3	-9,6~8,4	0,9~2,0	10 ⁻¹² ~10 ⁻⁶ M

CAS-nr: 57-91-0					
Kortikosteron CAS-nr: 50-22-6	–	–	–	–	$10^{-10}\sim 10^{-4}\text{M}$
17 α -metylttestosteron CAS-nr: 58-18-4	– 6,0~ 5,1	– 8,0~ 6,2	–	–	$10^{-11}\sim 10^{-5}\text{M}$

Positiva och negativa referensstandarder för ER-antagonisttestet

15. Före och under studien bör testsystemets responsförmåga kontrolleras med hjälp av lämpliga koncentrationer av ett positivt ämne (tamoxifen) och ett negativt ämne (flutamid). Godtagbara intervallvärden som härletts från valideringsstudien (1) anges i tabell 2. Dessa två parallella referensstandarder bör ingå i varje försök och resultaten bör bedömas som korrekta enligt kriterierna. Om så inte är fallet bör man fastställa orsaken till att kriterierna inte har uppfyllts (t.ex. hantering av cellerna, kvalitet och koncentration hos serum och antibiotika), och därefter upprepa testet. Dessutom bör IC_{50} -värden för ett positivt ämne (tamoxifen) beräknas och resultaten bör falla inom givna godtagbara gränser. När acceptanskriterierna har uppfyllts är det viktigt att cellodlingsmaterialet används på ett konsekvent sätt för att säkerställa minimal variation hos IC_{50} -värdena. De två parallella referensstandarderna, som bör ingå i varje försök (som utförs under samma förhållanden, inklusive material, cellernas passagenivå och av samma tekniker), kan säkerställa testets sensitivitet (se tabell 2).

Tabell 2: Kriterier och godtagbara intervallvärden för de två referensstandarderna för ER-antagonisttestet

Namn	Kriterier	Log IC_{50}	Testintervall
Tamoxifen CAS-nr: 10540-29-1	Positivt: IC_{50} bör beräknas.	-5,942~–7,596	$10^{-10}\sim 10^{-5}\text{M}$
Flutamid CAS-nr: 13311-84-7	Negativt: IC_{30} bör inte beräknas.	-	$10^{-10}\sim 10^{-5}\text{M}$

Positiva kontroller och vehikelkontroller

16. Den positiva kontrollen för ER-agonisttest (1 nM av E2) och för ER-antagonisttest (10 μM tamoxifen) bör testas i minst tre replikat på varje platta. Den vehikel som används för att lösa upp testkemikalien bör testas som vehikelkontroll i minst tre replikat på varje platta. Om en annan vehikel används i den positiva kontrollen än för testkemikalien, bör en annan vehikelkontroll utöver denna vehikelkontroll testas i minst tre replikat på samma platta med den positiva kontrollen.

Kvalitetskriterier för ER-agonisttest

17. Medelvärde för luciferasaktiviteten i den positiva kontrollen (1 nM E2) bör vara minst fyra gånger medelvärde för den positiva kontrollen på varje platta. Detta kriterium fastställs på grundval av hur tillförlitliga endpoint-värdena från valideringsstudien är (historiskt mellan fyra och trettio gånger).

18. När det gäller kvalitetskontrollen av testet bör den x-faldiga induktion som motsvarar PC₁₀-värdet för den parallella positiva kontrollen (1 nM E2) vara högre än $n \pm 2SD$ av den x-faldiga induktionen (= 1) för den parallella vehikelkontrollen. För prioriteringssyften kan PC₁₀-värdet vara användbart för att förenkla den nödvändiga dataanalysen jämfört med en statistisk analys. En statistisk analys ger visserligen information om signifikans men är inte en kvantitativ parameter för den koncentrationsbaserade potentialen, och är därför mindre användbar i prioriteringssyfte.

Kvalitetskriterier för ER-antagonisttest

19. Medelvärde för luciferasaktiviteten i den spikade kontrollen (25 pM E2) bör vara minst fyra gånger medelvärdet för den positiva kontrollen på varje platta. Detta kriterium fastställs på grundval av hur tillförlitliga endpoint-värdena från valideringsstudien är.
20. Vad gäller kvalitetskontrollen av testet bör den relativa transkriptionella aktiveringen (RTA) av 1 nM E2 vara större än 100 %, RTA av 1 µM 4-hydroxitamoxifen (OHT) vara mindre än 40,6 % och RTA av 100 µM Digitonin (Dig) vara mindre än 0 %.

Demonstration av laboratoriets kompetens (se punkt 14 och tabellerna 3 och 4 i ”Komponenter i ER TA-test” i denna testmetod).

Vehikel

21. Dimetylsulfoxid (DMSO) eller ett lämpligt lösningsmedel vid samma koncentration som används för de olika positiva och negativa kontrollerna samt testkemikalierna bör användas som parallell vehikelkontroll. Testkemikalierna bör lösas upp i ett lämpligt lösningsmedel som är blandbart med cellmediet. Vatten, etanol (renhetsgrad 95 % till 100 %) och DMSO är lämpliga vehiklar. Om DMSO används bör nivån inte överskrida 0,1 % (v/v). För alla vehiklar ska det visas att den maximala volym som används inte är cytotoxisk och inte har en störande verkan på genomförandet av testet.

Beredning av testkemikalierna

22. Generellt bör testkemikalierna lösas upp i DMSO eller ett annat lämpligt lösningsmedel och spädas ut i omgångar med samma lösningsmedel vid ett gemensamt intervall på 1:10 för att bereda lösningar med utspädning med mediet.

Löslighet och cytotoxicitet: överväganden för koncentrationsintervalltest

23. Ett förberedande test bör göras för att fastställa lämpligt koncentrationsintervall för den kemikalie som ska testas och för att utröna om testkemikalien har några löslighets- och cytotoxicitetsproblem. Inledningsvis testas kemikalierna upp till den högsta koncentrationen på 1 µl/ml, 1 mg/ml eller 1 mM, beroende på vilken koncentration som är lägst. Baserat på omfattningen av cytotoxicitet eller bristande lösningsförmåga som observerats under det förberedande testet, bör den första definitiva testomgången testa kemikalien vid logaritmisk seriespädning, med utgångspunkt från den högsta godtagbara koncentrationen (t.ex. 1 mM,

100µM, 10µM, osv.). Förekomst av grumlighet, fällningar eller cytotoxicitet ska noteras. Koncentrationerna i den andra och vid behov den tredje testomgången bör om nödvändigt justeras för att bättre karakterisera koncentrationens responskurva och undvika koncentrationer som konstateras vara olösliga eller ger överdriven cytotoxicitet.

24. För ER-agonister och ER-antagonister kan ökande nivåer av cytotoxicitet avsevärt ändra eller eliminera den typiska sigmoidala (S-formiga) responsen, vilket bör vägas in i datatolkningen. Testmetoder för cytotoxicitet som kan ge information om 80 % cellviabilitet bör användas, med hjälp av ett lämpligt test baserat på laboratoriets erfarenhet.
25. Om resultatet av cytotoxicitetstestet visar att koncentrationen av testkemikalien har minskat cellantalet med 20 % eller mer bör denna koncentration anses vara cytotoxisk, och koncentrationer vid eller över den cytotoxiska koncentrationen bör undantas från utvärderingen.

Kemisk exponering och beredning av testplattor

26. Förfarandet för kemiska utspädningar (steg-1 och steg-2) samt exponering till cellerna (steg-3) kan utföras enligt följande:

Steg-1: Varje testkemikalie bör spädas ut i omgångar i DMSO eller ett lämpligt lösningsmedel och överförs till hålen i en mikrotiterplatta för att uppnå slutliga seriekoncentrationer enligt det förberedande testet för att bestämma koncentrationsintervall (vanligen i serier av exempelvis 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM och 10 pM (10^{-3} – 10^{-11} M)) för triplikattestning.

Steg-2: Kemisk utspädning: Späd först ut 1,5 µl av testkemikalien i lösningsmedlet till en volym på 500 µl av mediet.

Steg-3: Kemisk exponering av cellerna: Överför 50 µl spädning till mediet (som förbereddes i steg-2) till en testbrunn som innehåller 10^4 celler/100 µl/brunn.

Den rekommenderade slutliga volymen av medium som behövs för varje brunn är 150 µl. Testprov och referensstandarder kan fördelas enligt tabellerna 3 och 4.

Tabell 3: Exempel på fördelning av koncentrationer av referensstandarderna i testplattan i ER-agonisttestet

Rad	17α-metyltestosteron			Kortikosteron			17α-östradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 µM)	→	→	100 µM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 µM)	→	→	10 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Vehikelkontroll (0,1 % DMSO). PC: Positiv kontroll (1 nM E2)

27. Referensstandarderna (E2, 17 α -östradiol, 17- μ ετγλτεστοστερον οχη κορτικοστερον) β)ρ τεστασι παρφε testomgång (tabell 3). Hål för positiva kontroller som behandlas med 1 nM av E2 som kan ge maximal induktion av E2 och hål för vehikelkontroll som endast behandlas med DMSO (eller lämpligt lösningsmedel) bör ingå i varje testplatta (tabell 4). Om celler från olika källor (t.ex. olika passagenummer, olika partier osv.) används i samma försök bör referensstandarderna testas för varje cellkälla.

Tabell 4: Exempel på fördelning av koncentrationer av test- och kontrollkemikalierna i testplattan i ER-agonisttest

Rad	Testkemikalie 1			Testkemikalie 2			Testkemikalie 3			Testkemikalie 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μ M)	→	→	1 mM	→	→	1 μ m	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μ M)	→	→	100 μ m	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	10 μ m	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc 4 (10 nM)	→	→	1 μ m	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Vehikelkontroll (0,1 % DMSO). PC: Positiv kontroll (1 nM E2)

Tabell 5: Exempel på fördelning av koncentrationer av referensstandarderna i testplattan i ER-antagonisttest

Rad	Tamoxifen			Flutamid			Testkemikalie 1			Testkemikalie 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μ M)	→	→	10 μ m	→	→	10 μ m	→	→	10 μ m	→	→
B	konc. 2 (1 μ M)	→	→	1 μ m	→	→	1 μ m	→	→	1 μ m	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 μ M OHT	→	→	100 μ M Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Vehikelkontroll (0,1 % DMSO), PC: Positiv kontroll (1 nM E2), OHT :4-hydroxitamoxifen, Dig:

Dig: Digoxin
 = spikad med 25pM E2.

28. För att utvärdera kemikaliers antagonistiska aktivitet bör testhålen i raderna A till G spikas med 25pM E2. Referensstandarderna (tamoxifen och flutamid) bör testas i varje testomgång. Hål för positiv kontroll som behandlats med 1 nM av E2, som kan användas som kvalitetskontroll för cellinjen hER α -HeLa-9903, hål för vehikelkontroll som behandlats med

DMSO (eller lämpligt lösningsmedel), 0,1 % DMSO-hål som behandlats med en tillsats av DMSO till den spikade E2 motsvarande hål med ”spikad kontroll”, hål som behandlats med den slutliga koncentrationen 1 µM OHT och hål som behandlats med 100 µM Dig bör ingå i varje testplatta (tabell 5). De efterföljande testplattorna bör utformas på samma sätt, men utan referensstandardhålen (tabell 6). Om celler från olika källor används (t.ex. olika passageantal, olika partier osv.) används i samma försök bör referensstandarderna testas för varje cellkälla.

Tabell 6: Exempel på fördelning av koncentrationer av test- och kontrollkemikalierna i testplattan i ER-antagonisttest

Rad	Testkemikalie 1			Testkemikalie 2			Testkemikalie 3			Testkemikalie 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	konc. 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Vehikelkontroll (0,1 % DMSO), PC: Positiv kontroll (1 nM E2), OHT: 4-hydroxytamoxifen, Dig: Digitonin.

 : Spikad med 25pM E2.

29. Avsaknaden av kanteffekter bör bekräftas i förekommande fall, och om kanteffekter misstänks bör plattans utformning ändras för att undvika sådana effekter. Man kan till exempel använda en platta utan kanthål.
30. Efter tillsättningen av kemikalierna bör plattorna inkuberas i en 5 % CO₂-inkubator vid 37 ± 1 test °C i 20–24 timmar för att inducera rapportgenprodukterna.
31. Dessa föreningar bör behandlas särskilt försiktigt, eftersom de är mycket flyktiga. I sådana fall kan närliggande kontrollhål skapa falska positiva värden, och detta bör övervägas mot bakgrund av de förväntade och historiska kontrollvärdena. I de enstaka fall där flyktighet kan vara ett problem kan användning av ”plattförseglare” bidra till att effektivt isolera individuella hål under testningen, och rekommenderas därför i dessa fall.
32. Upprepade definitiva tester av samma kemikalie bör utföras på olika dagar för att säkerställa oberoende.

Luciferastest

33. En kommersiell luciferastestreagens (t.ex. Steady-Glo® Luciferase Assay System [Promega, E2510 eller motsvarande]) eller ett standardsystem för luciferastest (t.ex. Promega, E1500 eller motsvarande) kan användas för testet så länge acceptanskriterierna är uppfyllda.

Testreagenserna bör väljas beroende på sensitiviteten hos den luminometer som ska användas. Om standardsystemet för luciferastest används bör lyseringsreagens för cellodling (t.ex. Promega, E1531 eller motsvarande) användas innan substratet tillförs. Luciferasreagensen bör appliceras enligt tillverkarens anvisningar.

ANALYS AV DATA

ER-agonisttest

34. För att få fram den relativa transkriptionella aktiviteten jämfört med den positiva kontrollen (1 nM av E2) i ER-agonisttestet kan luminiscenssignalerna från samma platta analyseras enligt följande steg (andra likvärdiga matematiska processer är också godtagbara:

Steg 1. Beräkna medelvärdet för vehikelkontrollen.

Steg 2. Subtrahera medelvärdet för vehikelkontrollen från varje hålvärde för att normalisera data.

Steg 3. Beräkna medelvärdet för den normaliserade positiva kontrollen.

Steg 4. Dividera det normaliserade värdet för varje hål i plattan med medelvärdet för den normaliserade positiva kontrollen (PC = 100 %).

Det slutliga värdet för varje hål utgör den relativa transkriptionella aktiviteten för det hålet jämfört med PC-responsen.

Steg 5. Beräkna medelvärdet för den relativa transkriptionella aktiviteten för varje koncentrationsgrupp av testkemikalien. Det finns två dimensioner av responsen: den genomsnittliga transkriptionella aktiviteten (respons) och den koncentration vid vilken responsen inträffar (se följande avsnitt).

Överväganden i fråga om induktion av EC₅₀, PC₅₀ och PC₁₀

35. Det krävs en fullständig koncentrationsresponskurva för att beräkna EC₅₀, men detta kanske inte alltid är möjligt eller praktiskt till följd av begränsningar i testkoncentrationsintervallet (till exempel på grund av problem med cytotoxicitet eller löslighet). Eftersom EC₅₀ och högsta induktionsnivå (motsvarande toppvärdet i Hill-ekvationen) är informativa parametrar bör dessa rapporteras om så är möjligt. Lämplig statistisk programvara bör användas för beräkningen av EC₅₀ och högsta induktionsnivå (t.ex. statistikprogramvaran Graphpad Prism). Om Hills logistiska ekvation är tillämplig på koncentrationsresponsdata bör EC₅₀ beräknas enligt följande ekvation (7):

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{\exp((\log \text{EC}_{50} - X) \times \text{Hill slope}))}, \text{ där}$$

X är koncentrationens logaritm, och

Y är svaret. Y startar i botten och går upp till toppen i en S-kurva. Botten är fastställd till noll i

Hills logistiska ekvation.

36. Följande uppgifter bör lämnas för varje testkemikalie:

RPC_{Max} , som är den maximala responsnivå som induceras av en testkemikalie, uttryckt som en procentenhet av den respons som 1 nM E2 inducerar på samma platta, samt PC_{Max} (den koncentration som sammanhänger med RPC_{Max}), och

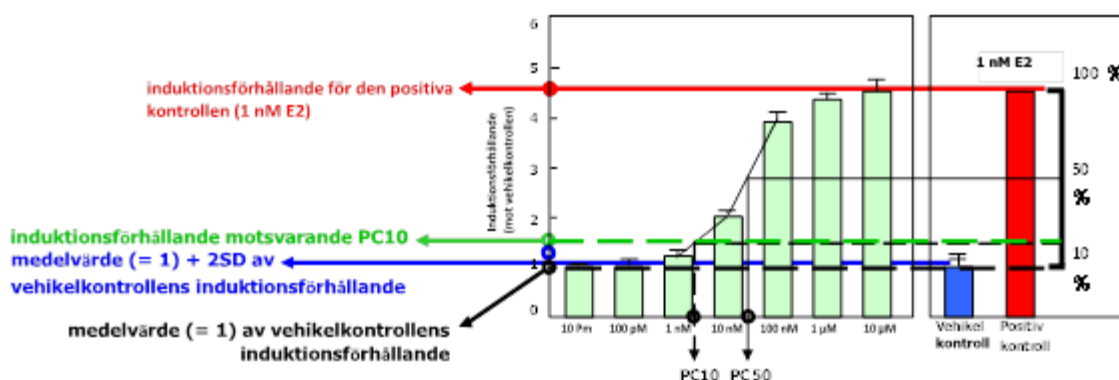
för positiva kemikalier, de koncentrationer som inducerar PC_{10} och, i förekommande fall, PC_{50} .

37. PC_x -värdet kan beräknas genom interpolering mellan två punkter på X-Y-koordinaten, en omedelbart över och en omedelbart under ett PC_x -värde. När de datapunkter som ligger omedelbart över och under PC_x -värdet har koordinaterna (a,b) respektive (c,d) kan PC_x -värdet beräknas med följande ekvation:

$$\log[PC_x] = \log[c] + (x-d)/(d-b)$$

38. PC-värdena beskrivs i figur 1 nedan.

Figur 1: Exempel på härledning av PC-värden PC_{10} och PC_{50} för 1 nM E2 induceras på varje testplatta.



ER-antagonisttest

39. För att få fram den relativa transkriptionella aktiviteten (RTA) jämfört med den spikade kontrollen (25 pM av E2) i ER-antagonisttestet kan luminiscenssignalerna från samma platta analyseras enligt följande steg (andra likvärdiga matematiska processer är också godtagbara:

Steg 1. Beräkna medelvärdet för vehikelkontrollen.

Steg 2. Subtrahera medelvärdet för vehikelkontrollen från varje hålvärde för att normalisera data. Steg 3. Beräkna medelvärdet för den normaliserade spikade kontrollen.

Steg 4. Dividera det normaliserade värdet för varje hål i plattan med medelvärdet för den normaliserade spikade kontrollen (spikad kontroll = 100 %).

Det slutliga värdet för varje hål utgör den relativa transkriptionella aktiviteten för det hålet jämfört med responsen på den spikade kontrollen.

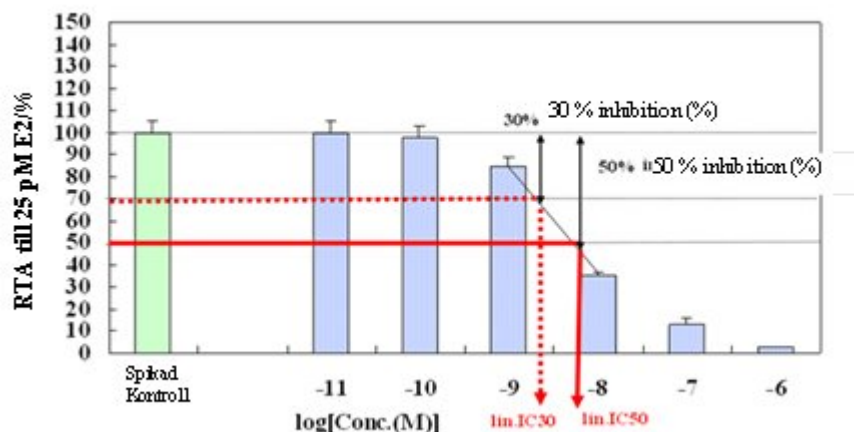
Steg 5. Beräkna medelvärdet för den relativa transkriptionella aktiviteten för varje behandling.

Överväganden i fråga om induktion av IC₃₀ och IC₅₀

40. För positiva kemikalier bör de koncentrationer som inducerar IC₃₀ och i förekommande fall IC₅₀ anges.
41. IC_x-värdet kan beräknas genom interpolering mellan två punkter på X-Y-koordinaten, en omedelbart över och en omedelbart under ett IC_x-värde. När de datapunkter som ligger omedelbart över och under IC_x-värdet har koordinaterna (c,d) respektive (a,b) kan IC_x-värdet beräknas med följande ekvation:

$$\text{lin IC}_x = a - (b - (100 - x)) (a - c) / (b - d)$$

Figur 2: Exempel på hur man härleder IC-värden Den spikade kontrollen (25 pM E2) inkluderas på varje testplatta.



RTA: relativ transkriptionsaktivitet.

42. Resultaten bör baseras på två (eller tre) oberoende testomgångar. Om två testomgångar ger jämförbara och därför reproducerbara resultat är det inte nödvändigt att utföra en tredje testomgång. För att vara godtagbara bör resultaten

- uppfylla acceptanskriterierna (se Acceptanskriterier, punkterna 14–20),
- vara reproducerbara.

Datatolkningskriterier

Tabell 7: Positiva och negativa beslutskriterier i ER-agonisttest

Positivt	Om ett RPC_{Max} erhålls som motsvarar eller överskrider 10 % av responsen i den positiva kontrollen i minst två av två eller två av tre testomgångar.
Negativt	Om RPC_{Max} inte når minst 10 % av responsen i den positiva kontrollen i två av två eller två av tre testomgångar.

Tabell 8: Positiva och negativa beslutskriterier i ER-antagonisttest

Positivt	Om IC_{30} beräknas i minst två av två eller två av tre testomgångar.
Negativt	Om IC_{30} inte kan beräknas i två av två eller två av tre testomgångar.

43. Datatolkningskriterierna anges i tabellerna 7 och 8. Positiva resultat karakteriseras av både effektens omfattning och den koncentration vid vilken effekten uppstår. Båda dessa mål uppnås genom att resultaten uttrycks som en koncentration vid vilken 50 % (PC_{50}) eller 10 % (PC_{10}) av PC -värdena uppnås för agonisttestet, och 50 % (IC_{50}) eller 30 % (IC_{30}) av värdet för den spikade kontrollen hämmas för antagonisttestet. Testkemikalien anses dock

vara positiv om den maximala respons som induceras av testkemikalien (RPCMax) motsvarar eller överskrider 10 % av den positiva kontrollens respons i minst två av två eller två av tre testomgångar. Testkemikalien anses vara negativ om RPCMax inte uppnår minst 10 % av den positiva kontrollens respons i två av två eller två av tre testomgångar.

44. Beräkningarna av PC_{10} , PC_{50} och PC_{Max} i ER-agonisttestet samt IC_{30} och IC_{50} i ER-antagonisttestet kan göras med hjälp av ett kalkylblad som finns tillgängligt tillsammans med testriktlinjen på OECD:s offentliga webbplats¹.
45. Det bör vara tillräckligt att erhålla värden för PC_{10} eller PC_{50} respektive IC_{30} eller IC_{50} minst två gånger. Om de resulterande basvärdena för data i samma koncentrationsintervall uppvisar variationer med en oacceptabelt hög variationskoefficient (CV, %) kan data anses otillförlitliga. I så fall bör källan till den höga variationen identifieras. Variationskoefficienten av rådatatriplikat (dvs. luminiscensintensitetsdata) för de datapunkter som används för beräkningen av PC_{10} bör vara lägre än 20 %.
46. Om acceptanskriterierna uppfylls innebär detta att testsystemet fungerar korrekt, men det säkerställer inte att en viss testomgång kommer att ge korrekta data. Att upprepa resultaten från den första testomgången är det bästa sättet att försäkra sig om att korrekta data har erhållits.
47. När det gäller ER-agonisttest, som kräver mer information utöver screening- och prioriteringsändamålen för denna testriktlinje för positiva testkemikalier, särskilt PC_{10} - PC_{49} -kemikalier och kemikalier som misstänks överstimulera luciferas, kan bekräftelse på att den observerade luciferasaktiviteten endast är en $ER\alpha$ -specifik respons fås med hjälp av en $ER\alpha$ -antagonist (se tillägg 2.1).

TESTRAPPORT

48. Se punkt 20 i "Komponenter i ER TA-testet".

¹ <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

LITTERATUR

- (1) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 225), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (2) Escande A., et al. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459–1469.
- (3) Kuiper G.G., et al. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.*, 139, 4252–4263.
- (4) Spaepen M., et al. (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, *FEMS Microbiol. Lett.*, 78(1), 89–94.
- (5) Kobayashi H., et al. (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769–771.
- (6) Dussurget O. och Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(3), 953–959.
- (7) De Lean A., Munson P.J. och Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, *Am. J. Physiol.*, 235, E97–E102.

Tillägg 2.1

FALSKT POSITIVT VÄRDE: BEDÖMNING AV EJ RECEPTORMEDIERADE LUMINISCENSSIGNALER

1. Falska positiva värden i ER-agonisttestet kan genereras av ej ER-medierad aktivering av luciferasgenen eller direkt aktivering av genprodukten eller orelaterad fluorescens. Sådana effekter visar sig genom en ofullständig eller ovanlig dosresponskurva. Om sådana effekter misstänks bör effekten av en ER-antagonist (t.ex. 4-hydroxitamoxifen (OHT) vid icke-toxisk koncentration) på responsen undersökas. Den rena antagonisten ICI 182780 är kanske inte lämplig för detta syfte eftersom en tillräcklig koncentration av ICI 182780 kan sänka VC-värdet, vilket i sin tur påverkar dataanalysen.
2. För att säkerställa att detta tillvägagångssätt är giltigt måste följande testas i samma platta:
 - Den okända kemikaliens agonistiska aktivitet med/utan 10 μ M OHT.
 - Vehikelkontroll (i triplikat).
 - OHT (i triplikat).
 - 1 nM av E2 (i triplikat) som agonistisk positiv kontroll.
 - 1 nM av E2 + OHT (i triplikat).

Datatolkningskriterier

Anmärkning: Samtliga hål bör behandlas med samma koncentration av vehikeln.

- Om den okända kemikaliens agonistiska aktivitet INTE påverkas av behandlingen med ER-antagonisten klassificeras den som "negativ".
- I fall där den okända kemikaliens agonistiska aktivitet hämmas fullständigt ska beslutskriterierna tillämpas.
- Om den agonistiska aktiviteten vid den lägsta koncentrationen motsvarar eller överskrider PC_{10} -responsen hämmas den okända kemikalien i en grad som motsvarar eller överskrider PC_{10} -responsen. Skillnaden i respons mellan de hål som inte har behandlats och de hål som har behandlats med ER-antagonisten beräknas. Denna skillnad bör anses motsvara den verkliga responsen och bör användas för beräkningen av lämpliga parametrar som underlag för ett klassificeringsbeslut.

Dataanalys

Kontrollera prestandastandarden.

Kontrollera variationskoefficienten mellan hål som behandlats under samma förhållanden.

1. Beräkna variationskoefficientens medelvärde.
2. Subtrahera variationskoefficientens medelvärde från värdet för varje hål som **inte** har behandlats med OHT.
3. Beräkna medelvärdet för OHT.
4. Subtrahera variationskoefficientens medelvärde från värdet för varje hål som har behandlats med OHT.
5. Beräkna den positiva kontrollens medelvärde.
6. Beräkna den relativa transkriptionella aktiviteten för alla andra hål i förhållandet till den positiva kontrollen.

Tillägg 2.2

BEREDNING AV SERUM BEHANDLAT MED DEXTRANBELAGT TRÄKOL (DCC)

1. Behandling av serum med dextranbelagt träkol (DCC) är en generell metod för att eliminera östrogenföreningar från serum som tillförs cellmedier. Syftet är att utesluta missvisande respons som är förknippad med östrogenrester i serumet. 500 ml fetalt bovinserum (FBS) kan behandlas genom detta förfarande.

Komponenter

2. Följande material och utrustning kommer att behövas:

Material

Aktivt träkol.

Dextran.

Magnesiumkloridhexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

Sackaros.

1 M HEPES buffertlösning (pH 7.4).

Ultrarent vatten som producerats från ett filtersystem.

Utrustning

Autoklaverad glasbehållare (av lämplig storlek), en vanlig laboratoriecentrifug (som kan hålla en temperatur på 4 °C).

Förfarande

3. Följande förfarande har anpassats till användning av 50 ml centrifugprovrör:

[Dag-1] Bered en suspension av dextranbelagt träkol med 1 liter ultrarent vatten som innehåller 1,5 mM MgCl_2 , 0,25 M sackaros, 2,5 g träkol, 0,25 g dextran och 5 mM HEPES, och rör om vid 4 °C över natten.

[Dag-2] Fördela suspensionen i 50 ml centrifugprovrör och centrifugera vid 10 000 rpm vid 4 °C i 10 minuter. Avlägsna supernatanten och lagra hälften av träkolssedimentet vid 4 °C för användning på dag-3. Suspendera den andra hälften av träkolet med FBS som har tinats något för att undvika fällning och värmeinaktiverats vid 56 °C i 30 minuter, överför sedan träkolet till en autoklaverad glasbehållare, t.ex. en E-kolv. Låt suspensionen stå under omrörning vid 4 °C över natten.

[Dag-3] Fördela suspensionen med FBS i centrifugprovrör för centrifugering vid 10 000 rpm

vid 4 °C i 10 minuter. Samla in FBS och överför det till det nya träkolssediment som bereddes och lagrades på dag-2. Suspendera träkolssedimentet och låt suspensionen stå under försiktig omrörning i en autoklaverad glasbehållare vid 4 °C över natten.

[Dag-4] Fördela suspensionen för centrifugering vid 10 000 rpm vid 4 °C i 10 minuter och sterilisera supernatanten genom att filtrera den genom ett 0,2 µm sterilt filter. Denna DCC-behandlade FBS bör lagras vid –20 °C och kan användas i upp till ett år.

TILLÄGG 3

TESTMETOD MED TRANSAKTIVERING AV ÖSTROGENRECEPTORN VM7LUC FÖR IDENTIFIERING AV ÖSTROGENRECEPTORERS AGONISTER OCH ANTAGONISTER

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR (SE ÄVEN ALLMÄN INLEDNING)

1. Denna testmetod använder cellinjen VM7Luc4E2¹. Den har validerats av National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) och Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) (1). VM7Luc-cellinjerna uttrycker framför allt endogena ER α och en mindre mängd endogent ER β (2) (3) (4).
2. Denna metod är tillämplig på många olika ämnen, förutsatt att de är lösliga i dimetylsulfoxid (DMSO, CAS-nr 67-68-5), inte reagerar med DMSO eller cellodlingsmediet och inte är cytotoxiska vid de testade koncentrationerna. Om det inte är möjligt att använda DMSO kan en annan vehikel, såsom etanol eller vatten, användas i stället (se punkt 12). Den demonstrerade prestandan hos (ant)agonistmetoden VM7Luc ER TA tyder på att testet kan ge information om ER-medierade verkningssätt och att det kan övervägas i samband med prioritering av ämnen för ytterligare testning
3. Denna metod är särskilt utformad för att detektera hER α - och hER β -medierad transaktivering genom att mäta kemiluminiscens som endpoint. Det är vanligt att kemiluminiscens används i biologiska tester, eftersom luminiscens har ett högt signal-brusförhållande(10). Firefly-luciferasaktiviteten i cellbaserade tester kan dock förväxlas med ämnen som hämmar luciferasenzymet, vilket orsakar både en uppenbar inhibering eller ökad luminiscens på grund av proteinstabilisering(10). I vissa luciferasbaserade tester med ER-rapportgener har

¹ Före juni 2016 betecknades denna cellinje som BG1Luc. BG-1-cellerna beskrevs först av Geisinger et al. (1998) (12), och karakteriserades senare av forskare vid National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (13). Relativt nyligen upptäckte man att det finns två olika varianter av BG-1-celler som används av forskare, BG-1 Fr och BG-1 NIEHS. En djupgående analys, inklusive DNA-testning, av dessa två varianter av cellinjen BG-1, som utfördes av Li och medarbetare (2014) (14), visade att BG-1 Fr är unik och att BG-1 NIEHS, dvs. den cellinje som ursprungligen användes för att utveckla metoden, inte är cellinjen BG1 från human äggstockscancer, utan i stället är en variant av cellinjen MCF7 från human bröstcancer. Den cellinje som används i testet, som ursprungligen benämndes BG1Luc4E2 (15), kommer nu att betecknas som VM7Luc4E2 ("V" = variant, "M7" = MCF7-celler). Testmetoden kommer nu att betecknas VM7Luc ER TA. Detta innebär visserligen ett ändrat ursprung för den cellinje som metoden bygger på, men det påverkar inte publicerade valideringsstudier eller nyttan med och tillämpningen av detta test för screening av östrogena/antiöstrogena kemikalier.

dessutom ej receptormedierade luminiscenssignaler rapporterats vid fytoöstrogena koncentrationer högre än 1 µM till följd av överaktivering av luciferasrapportgenen(9) (11). Dosresponskurvan visar att den faktiska aktiveringen av östrogenreceptorsystemet inträffar vid lägre koncentrationer, men det luciferasuttryck som erhålls vid höga koncentrationer av fytoöstrogen eller liknande föreningar som misstänks producera fytoöstrogenlik överaktivering av luciferasrapportgenen, måste undersökas noggrant i stabilt transfekterade ER TA-testsystem (se tillägg 2).

4. Avsnitten "Allmän inledning" och "Komponenter i ER TA-testet" bör läsas innan denna testmetod används för lagstadgade ändamål. Definitioner och förkortningar som används i denna testmetod beskrivs i tillägg 1.

PRINCIPER FÖR METODEN(SE ÄVEN ALLMÄN INLEDNING)

5. Metoden används för att indikera ligandbindning till östrogenreceptorer, följt av translokering av receptorligandkomplexet till kärnan. I kärnan binds receptor–ligandkomplexet till specifika DNA-responselement och transaktiverar rapportgenen (*luc*). Då produceras luciferas som sedan släpper ut ljus som kan kvantifieras med en luminometer. Luciferasaktivitet kan utvärderas snabbt och till låg kostnad med ett antal kommersiellt tillgängliga kit. VM7Luc ER TA använder VM7, en adenokarcinom cellinje från mänskligt bröst som är mottaglig för östrogenreceptorer, och har transfekterats stabilt med en firefly-*luc*-rapportgen under kontroll av fyra östrogenresponselement som har placerats uppströms från musens MMTV-promotor för att detektera ämnen med agonistisk eller antagonistisk aktivitet in vitro i östrogenreceptorerna. Denna MMTV-promotor uppvisar endast smärre korsreaktivitet med andra steroid- och icke-steroidhormoner (8). Datatolkningskriterierna beskrivs i detalj i punkt 41. Kortfattat identifieras positiv respons genom en koncentrationsresponskurva vid minst tre punkter, utan överlappande felstaplar (medelvärde ± SD), samt en förändring i omfånget (normaliserad relativ ljusenhet [*normalised relative light unit* RLU]) på minst 20 % av det maximala värdet för referensstandard (17β-östradiol [E2; CAS-nr 50-28-2] för agonisttestet, raloxifen HCl [Ral, CAS-nr 84449-90-1]/E2 för antagonisttestet).

FÖRFARANDE

Cellinje

6. Den stabilt transfekterade cellinjen VM7Luc4E2 bör användas i testet. Cellinjen finns för närvarande endast tillgänglig med ett tekniskt licensavtal från University of California,

Davis, Kalifornien, USA¹ och från Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, North Carolina USA².

Cellinjens stabilitet

7. För att bibehålla cellinjens stabilitet och integritet bör cellerna odlas mer än en passage från den frysta stammen i cellunderhållsmediet (se punkt 9). Cellerna bör inte odlas mer än 30 passager. För cellinjen VM7Luc4E2 cell line tar 30 passager omkring tre månader.

Betingelser för cellodling och överföring till platta

8. De rutiner som anges i vägledningen om god praxis för cellodling (5) (6) bör följas för att säkerställa kvalitet hos alla material och metoder och på så sätt bibehålla arbetets integritet, giltighet och reproducerbarhet.
9. VM7Luc4E2-cellerna förvaras i ett RPMI 1640-medium kompletterat med 0,9 % Pen-Strep och 8,0 % fetalt bovinserum (FBS) i en särskild vävnadsodlingsinkubator vid 37 ± 1 °C, $90 \% \pm 5\%$ luftfuktighet och $5,0 \% \pm 1 \%$ CO₂/luft.
10. När VM7Luc4E2-cellerna når ~80 % konfluens subkultiveras och konditioneras de till en östrogenfri miljö i 48 timmar innan cellerna överförs till 96-hålsplattor för exponering för testkemikalierna och analys av östrogenberoende induktion av luciferasaktivitet. Det östrogenfria mediet (EFM) innehåller Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) utan fenolrött, kompletterat med 4,5 % träkols-/dextranbehandlat fetalt bovinserum (FBS), 1,9 % L-glutamin och 0,9 % Pen-Strep. Alla plastvaror bör vara fria från östrogenaktivitet [se detaljerat protokoll (7)].

Acceptanskriterier

11. Godkännandet eller förkastandet av ett test baseras på en utvärdering av referensstandarden och kontrollresultaten från varje försök, som utförts på en 96-hålsplatta. Varje referensstandard testas i flera koncentrationer och det ska finnas flera prov av varje referens- och kontrollkoncentration. Resultaten jämförs med kvalitetskontrollerna för dessa parametrar som härletts från de historiska databaser över agonistisk och antagonistisk aktivitet som varje laboratorium skapar när de visar sin kompetens. De historiska databaserna uppdateras kontinuerligt med värden för referensstandarden och kontrollerna. Ändringar i utrustning eller laboratorieförhållanden kan göra det nödvändigt att uppdatera de historiska databaserna.

¹ Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, E: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649

² Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, e-post: info@dioxins.com, tfn: 919-688-4804, fax: 919-688-4404

Agonisttest

Förberedande test för att bestämma koncentrationsintervall

- Induktion: Plattornas induktion bör mätas genom att den genomsnittligt högsta E2-referensstandardens RLU-värde jämförs med det genomsnittliga RLU-värdet för DMSO-kontrollen. Femfaldig induktion uppnås vanligen, men för att godtas måste induktionen vara minst fyrfaldig.
- DMSO-kontrollresultat: Lösningsmedelskontrollens RLU-värden bör hålla sig inom 2,5 gånger standardavvikelsen för den historiska lösningskontrollens RLU-medelvärde.
- Försök som inte uppfyller ett av dessa acceptanskriterier bör förkastas och upprepas.

Fullständigt test

Det fullständiga testet innefattar acceptanskriterier för det förberedande agonisttestet samt följande:

- Resultat för referensstandard: E2-referensstandardens koncentrationsresponskurva bör vara S-formad och uppvisa minst tre värden inom den linjära delen av koncentrationsresponskurvan.
- Resultat för positiva kontroller: Metoxiklorkontrollens RLU-värden bör vara högre än DMSO-medelvärdet, plus tre gånger standardavvikelsen från DMSO-medelvärdet.
- Försök som inte uppfyller ett av acceptanskriterierna bör förkastas och upprepas.

Antagonisttest

Förberedande test

- Reduktion: Plattornas reduktion mäts genom att den genomsnittligt högsta Ral/E2-referensstandardens RLU-värde jämförs med det genomsnittliga RLU-värdet för DMSO-kontrollen. Femfaldig reduktion uppnås vanligen, men för att godtas måste reduktionen vara minst trefaldig.
- E2-kontrollresultat. E2-kontrollens RLU-värden bör hålla sig inom 2,5 gånger standardavvikelsen för den historiska E2-kontrollens RLU-medelvärde.
- DMSO-kontrollresultat: DMSO-kontrollens RLU-värden bör hålla sig inom 2,5 gånger standardavvikelsen för den historiska lösningsmedelskontrollens RLU-medelvärde.
- Försök som inte uppfyller ett av acceptanskriterierna förkastas och upprepas.

Fullständigt test

Det fullständiga testet innefattar acceptanskriterier för det förberedande antagonisttestet samt följande:

- Resultat för referensstandard: Ral/E2-referensstandardens koncentrationsresponskurva bör vara S-formad och uppvisa minst tre värden inom den linjära delen av koncentrationsresponskurvan.

- Resultat för positiva kontroller: RLU-värdena för tamoxifen-/E2-kontrollen bör vara lägre än E2-kontrollens medelvärde minus tre gånger standardavvikelsen från E2-kontrollens medelvärde.
- Försök som inte uppfyller ett av acceptanskriterierna förkastas och upprepas.

Referensstandarder, positiva kontroller och vehikelkontroller

Vehikelkontroll (agonist- och antagonisttest)

12. Den vehikel som används för att lösa upp testkemikalierna bör testas som vehikelkontroll. Den vehikel som användes under valideringen av VM7Luc ER TA-testet var 1 % (v/v) dimetylsulfoxid (DMSO, CAS-nr 67-68-5) (se punkt 24). Om en annan vehikel än DMSO används bör alla referensstandarder, kontroller och testkemikalier i förekommande fall testas i samma vehikel.

Referensstandard (förberedande agonisttest)

13. Referensstandarden är E2 (CAS-nr 50-28-2). För det förberedande testet består referensstandarderna av en seriespädning med fyra koncentrationer av E2 ($1,84 \times 10^{-10}$, $4,59 \times 10^{-11}$, $1,15 \times 10^{-11}$ och $2,87 \times 10^{-12}$ M), och varje koncentration testas i duplikathål.

Referensstandard (fullständigt agonisttest)

14. E2 för fullständig testning består av en seriespädning på 1:2 med elva koncentrationer (från $3,67 \times 10^{-10}$ till $3,59 \times 10^{-13}$ M) E2 i duplikathål.

Referensstandard (förberedande antagonisttest)

15. Referensstandarden är en kombination av Ral (CAS-nr 84449-90-1) och E2 (CAS-nr 50-28-2). Ral/E2 för förberedande testning består av en seriespädning med tre koncentrationer av Ral ($3,06 \times 10^{-9}$, $7,67 \times 10^{-10}$ och $1,92 \times 10^{-10}$ M), plus en fast koncentration ($9,18 \times 10^{-11}$ M) av E2 i duplikathål.

Referensstandard (fullständigt antagonisttest)

16. Ral/E2 för fullständig testning består av en seriespädning på 1:2 Ral (från $2,45 \times 10^{-8}$ till $9,57 \times 10^{-11}$ M), plus en fast koncentration ($9,18 \times 10^{-11}$ M) av E2 som består av nio koncentrationer av Ral/E2 i duplikathål.

Svag positiv kontroll (agonist)

17. Den svaga positiva kontrollen är $9,06 \times 10^{-6}$ M *p,p'*-metoxiklor (metoxiklor, CAS-nr 72-43-5) i EFM).

Svag positiv kontroll (antagonist)

18. Den svaga positiva kontrollen består av tamoxifen (CAS-nr 10540-29-1) $3,36 \times 10^{-6}$ M med $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 i EFM.

E2-kontroll (endast antagonisttest)

19. E2-kontrollerna är $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 i EFM och används som en referens för negativ kontroll.

Induktionsförhållande (agonist)

20. Induktionen av referensstandardens (E2) luciferasaktivitet mäts genom att E2-referensstandardens högsta genomsnittliga RLU-värde divideras med DMSO-kontrollens genomsnittliga RLU-värde, och resultatet bör inte vara högre än fyrfaldigt.

Induktionsreduktion (antagonist)

21. Medelvärde för referensstandardens (Ral/E2) luciferasaktivitet mäts genom att Ral/E2-referensstandardens högsta genomsnittliga RLU-värde divideras med DMSO-kontrollens genomsnittliga RLU-värde, och bör inte vara högre än trefaldigt.

Demonstration av laboratoriets kompetens (se punkt 14 och tabellerna 3 och 4 i ”Komponenter i ER TA-testet” i denna testmetod).

Vehikel

22. Testkemikalierna bör lösas upp i ett lämpligt lösningsmedel som är blandbart med cellmediet. Vatten, etanol (renhet 95 % till 100 %) och DMSO är lämpliga vehiklar. Om DMSO används bör nivån inte överskrida 1 % (v/v). För alla vehiklar ska det visas att den maximala volym som används inte är cytotoxisk och inte har en störande verkan på genomförandet av testet. Referensstandarderna och kontrollerna löses upp i 100 % lösningsmedel och späds därefter ned till lämpliga koncentrationer i EFM.

Beredning av testkemikalierna

23. Testkemikalierna löses upp i 100 % DMSO (eller lämpligt lösningsmedel) och späds därefter ned till lämpliga koncentrationer i EFM. Alla testkemikalier bör få anta rumstemperatur innan de löses upp och späds ut. Nya testkemikalielösningar bör beredas för varje försök. Lösningarna bör inte ha märkbara fällningar eller grumlighet. Referensstandarderna och kontrollstammarna kan beredas i bulk. Nya beredningar av den slutliga referensstandarderna, kontrollutspädningarna och testkemikalierna bör dock göras för varje försök och användas inom 24 timmar från beredningen.

Löslighet och cytotoxicitet: överväganden för koncentrationsintervalltest

24. Det förberedande testet består av sju-punkts 1:10 seriespädningar som körs i duplikat. Först testas testkemikalierna upp till den högsta koncentrationen på 1 mg/ml (~1 mM) för agonisttestet och 20 µg/ml (~10 µM) för antagonisttestet. Förberedande test används för att fastställa följande:
- Startkoncentrationer för testkemikalierna som ska användas under den fullständiga testningen

- Kemiska utspädningar för testkemikalierna (1:2 eller 1:5) som ska användas under den fullständiga testningen
25. En bedömning av cellviabilitet/cytotoxicitet ingår i protokollen för agonist- och antagonisttesterna (7) och integreras i de förberedande och fullständiga testerna. Den cytotoxicitetsmetod som användes för att bedöma cellviabilitet under valideringen av VM7Luc ER TA (1) var en skalad kvalitativ visuell observationsmetod. Det är dock även möjligt att använda en kvantitativ metod för att fastställa cytotoxicitet (se protokollet (7)). Data från testkemikaliekoncentrationer som orsakar mer än 20 % reduktion av viabiliteten kan inte användas.

Testkemikaliens exponering och beredning av testplattor

26. Cellerna räknas och överförs till 96-hålsplattor för vävnadsodling (2×10^5 celler per hål) i EFM och inkuberas i 24 timmar så att cellerna fäster vid plattan. EFM avlägsnas och ersätts med test- och referenskemikalierna i EFM och inkuberas i 19–24 timmar. Det är viktigt att vara särskilt försiktig med mycket flyktiga ämnen, eftersom närliggande kontrollhål kan skapa falska positiva resultat. I sådana fall kan användning av ”plattförseglare” bidra till att effektivt isolera individuella hål under testningen, och rekommenderas därför i dessa fall.

Förberedande tester för att bestämma koncentrationsintervall

27. Vid den förberedande testningen används alla hål i 96-hålsplattan för att testa kemikalier som sju-punkts 1:10 seriespädningar i duplikat (se figurerna 1 och 2).
- I den förberedande testningen av *agonister* används fyra koncentrationer av E2 i duplikat som referensstandard och fyra replikathål för DMSO-kontrollen.
 - I den förberedande testningen av *antagonister* används tre koncentrationer av Ral/E2 med $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 i duplikat som referensstandard, med tre replikathål för E2- och DMSO-kontrollerna.

Figur 1: Utformning av förberedande agonisttest med 96-hålsplatta

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Förkortningar: E2-1 till E2-4 = koncentrationer av referensstandard E2 (från hög till låg). TC1-1 till TC1-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 1 (TC1). TC2-1 till TC2-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 2 (TC2). TC3-1 till TC3-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 3 (TC3). TC4-1 till TC4-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 4 (TC4). TC5-1 till TC5-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 5 (TC5). TC6-1 till TC6-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 6 (TC6). VC = vehikelkontroll (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Figur 2: Utformning av förberedande antagonisttest med 96-hålsplatta

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Förkortningar: E2 = E2-kontroll. Ral-1 till Ral-3 = koncentrationer av referensstandarden raloxifen/E2 (från hög till låg). TC1-1 till TC1-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 1 (TC1). TC2-1 till TC2-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 2 (TC2). TC3-1 till TC3-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 3 (TC3). TC4-1 till TC4-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 4 (TC4). TC5-1 till TC5-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 5 (TC5). TC6-1 till TC6-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 6 (TC6). VC = vehikelkontroll (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Anmärkning: Alla testkemikalier testas i närvaro av $9,18 \times 10^{-11}$ M E2.

28. Den rekommenderade slutliga volymen av medium som behövs för varje brunn är 200 µl. Använd endast testplattor där cellerna i alla hål ger en viabilitet på minst 80 %.

29. Fastställande av startkoncentrationer för fullständig **agonist**-testning beskrivs i detalj i agonistprotokollet (7). Kortfattat används följande kriterier:

- Om det inte finns några punkter på testkemikaliens kurva som är högre än medelvärdet plus tre gånger standardavvikelsen för DMSO-kontrollen görs ett fullständigt test med användning av elva-punkts 1:2 seriespädning, med den maximala lösliga koncentrationen som utgångspunkt.
- Om det inte finns några punkter på testkemikaliens kurva som är högre än medelvärdet plus tre gånger standardavvikelsen för DMSO-kontrollen bör den startkoncentration som används för elva-punkts spädningsschemat i fullständig testning vara en log högre än den koncentration som ger det högsta justerade RLU-värdet i det förberedande koncentrationsintervalltestet. Elva-punktsschemat baseras antingen på en 1:2- eller 1:5-spädning enligt följande kriterier:

En elva-punkts 1:2-seriespädning bör användas om det resulterande koncentrationsintervallet omfattar all respons baserat på den koncentrationsresponskurva som fås fram genom det förberedande testet. Annars bör en 1:5-spädning användas.

- Om testkemikalien uppvisar en bifasisk koncentrationsresponskurva i det förberedande testet bör båda faserna även upplösas i den fullständiga testningen.

30. Fastställande av startkoncentrationer för fullständig **antagonist**-testning beskrivs i detalj i antagonistprotokollet (7). Kortfattat används följande kriterier:

- Om det inte finns några punkter på testkemikaliens kurva som är lägre än medelvärdet minus tre gånger standardavvikelsen för E2-kontrollen görs ett fullständigt test med användning av elva-punkts 1:2 seriespädning, med den maximala lösliga koncentrationen som utgångspunkt.
- Om det inte finns några punkter på testkemikaliens kurva som är lägre än medelvärdet minus tre gånger standardavvikelsen för E2-kontrollen bör den startkoncentration som används för elva-punkts spädningsschemat i fullständig testning vara en av följande:
 - Den koncentration som ger det lägsta justerade RLU-värdet i det förberedande testet.
 - Den maximala lösliga koncentrationen (se antagonistprotokollet (7), figur 14-2).
 - Den lägsta cytotoxiska koncentrationen (se relaterat exempel i antagonistprotokollet (7), figur 14-3).
- Elva-punktsschemat baseras antingen på en 1:2- eller 1:5-spädning enligt följande kriterier:

En elva-punkts 1:2-seriespädning bör användas om det resulterande koncentrationsintervallet omfattar all respons baserat på den koncentrationsresponskurva som fås fram genom det förberedande testet. Annars bör en 1:5-spädning användas.

Fullständiga tester

31. Det fullständiga testet består av elva-punkts seriespädningar (antingen 1:2- eller 1:5-seriespädningar baserat på startkoncentrationen för kriterierna för fullständig testning), där varje koncentration testas i tre hål i 96-hålsplattan (se figurerna 3 och 4).
- I den fullständiga testningen av *agonister* används elva koncentrationer av E2 i duplikat som referensstandard. Fyra replikathål för DMSO-kontrollen och fyra replikathål för metoxiklorkontrollen ($9,06 \times 10^{-6}$ M) finns med i varje platta.
 - I den fullständiga testningen av *antagonister* används nio koncentrationer av Ral/E2 med $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 i duplikat som referensstandard, med fyra replikathål för E2-kontrollen med $9,18 \times 10^{-11}$ M, fyra replikathål för DMSO-kontroller och fyra replikathål för tamoxifen $3,36 \times 10^{-6}$ M.

Figur 3: Utformning av fullständigt test av agonister med en 96-hålsplatta

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

Förkortningar: TC1-1 till TC1-11 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 1. TC2-1 till TC2-11 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 2. E2-1 till E2-11 = koncentrationer av referensstandarden E2 (från hög till låg). Meth = p,p'-metoxiklor, svag positiv kontroll. VC = DMSO (1 % v/v) EFM vehikelkontroll.

Figur 4: Utformning av fullständigt test av antagonister med en 96-hålsplatta

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Förkortningar: E2 = E2-kontroll. Ral-1 till Ral-9 = koncentrationer av referensstandarden raloxifen/E2 (från hög till låg). Tam = tamoxifen/E2, svag positiv kontroll. TC1-1 till TC1-11 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 1 (TC1). TC2-1 till TC2-11 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 2 (TC2). VC = vehikelkontroll (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Anmärkning: Såsom har påpekats innehåller alla referens- och testhål en fast koncentration av E2 (9,18 x 10⁻¹¹M).

32. Upprepade fullständiga tester av samma kemikalie bör utföras på olika dagar för att säkerställa oberoende. Minst två fullständiga tester bör utföras. Om testresultaten motsäger varandra (t.ex. om ett test är positivt och det andra negativt) eller om ett av testerna är olämpligt bör ett ytterligare tredje test utföras.

Mätning av luminiscens

33. Luminiscens mäts i intervallet 300 till 650 nm med användning av en injektionsluminometer och programvara som kontrollerar injiceringsvolymen och mätintervallet (7). Ljusemissionen från varje hål uttrycks som RLU per hål.

ANALYS AV DATA

Bestämning av EC₅₀ /IC₅₀

34. EC₅₀-värdet (halva den maximala effektiva koncentrationen av testkemikalien [agonister]) och IC₅₀-värdet (halva den maximala hämmande koncentrationen av testkemikalien [antagonister]) fastställs utifrån koncentrationsresponsdata. För testkemikalier som är positiva vid en eller flera koncentrationer beräknas den koncentration av testkemikalien som orsakar halva den maximala responsen (IC₅₀ eller EC₅₀) med hjälp av en Hillfunktionsanalys eller ett lämpligt alternativ. Hillfunktionen är en logistisk matematisk modell med fyra parametrar som kopplar testkemikaliekoncentrationen till responsen (som vanligen följer en S-kurva), med användning av nedanstående ekvation:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10^{(lgEC_{50} - X)Hill\ Slope}}$$

Där

Y = respons (dvs. RLU-värden),

X = koncentrationens logaritm.

Bottom = lägsta respons.

Top = högsta respons.

lg EC₅₀ (eller lg IC₅₀) = logaritmen för X som responsen halvvägs mellan topp och botten.

Hillslope = kurvans lutning.

Modellen beräknar den bästa passningen för parametrarna Top, Bottom, Hillslope samt IC₅₀ och EC₅₀. Lämplig statistisk programvara bör användas för beräkningen av värdena för EC₅₀ och IC₅₀ (t.ex. den statistiska programvaran Graphpad Prism^R).

Bestämning av avvikande värden ("outliers")

35. En god statistisk bedömning kan underlättas genom att inbegripa (men inte begränsat till) Q-testet (se agonist- och antagonistprotokollen (7)) för att bestämma "oanvändbara" hål som utesluts från dataanalysen.
36. För replikat av E2-referensstandarderna (två per koncentration) betraktas alla justerade RLU-värden för ett replikat vid en given E2-koncentration som avvikande värden om dess värde ligger mer än 20 % över eller under det justerade RLU-värdet för den koncentrationen i den historiska databasen.

Insamling och justering av luminometerdata för förberedande koncentrationsintervalltestning

37. Rådata från luminometern bör överföras till en kalkylbladsmall som har utformats för testet. Det bör bestämmas om det finns datapunkter som visar avvikande värden som måste tas bort. (Se testets acceptanskriterier för parametrar som bestäms i analyserna.) Följande beräkningar bör göras:

Agonist

- Steg 1 Beräkna medelvärdet för DMSO-vehikelkontrollen (VC).
- Steg 2 Subtrahera medelvärdet för DMSO-vehikelkontrollen från varje hålvärde för att normalisera data.
- Steg 3 Beräkna medelvärdet för referensstandardens induktionsförhållande (E2).
- Steg 4 Beräkna medelvärdet för EC₅₀-värdet för testkemikalierna.

Antagonist

- Steg 1 Beräkna medelvärdet för DMSO-vehikelkontrollen.
- Steg 2 Subtrahera medelvärdet för DMSO-vehikelkontrollen från varje hålvärde för att normalisera data.
- Steg 3 Beräkna medelvärdet för referensstandardens reduktionsförhållande (Ral/E2).
- Steg 4 Beräkna medelvärdet för E2-referensstandard.
- Steg 5 Beräkna medelvärdet för IC₅₀-värdet för testkemikalierna.

Insamling och justering av luminometerdata för fullständig testning

38. Rådata från luminometern bör överföras till en kalkylbladsmall som har utformats för testet. Det bör bestämmas om det finns datapunkter som visar avvikande värden som måste tas bort. (Se testets acceptanskriterier för parametrar som bestäms i analyserna.) Följande beräkningar görs:

Agonist

- Steg 1 Beräkna medelvärdet för DMSO-vehikelkontrollen.
- Steg 2 Subtrahera medelvärdet för DMSO-vehikelkontrollen från varje hålvärde för att normalisera data.
- Steg 3 Beräkna medelvärdet för referensstandardens induktionsförhållande (E2).
- Steg 4 Beräkna medelvärdet för EC₅₀-värdet för E2 och testkemikalierna.
- Steg 5 Beräkna det justerade RLU-medelvärdet för metoxiklor.

Antagonist

- Steg 1 Beräkna medelvärdet för DMSO-vehikelkontrollen.
- Steg 2 Subtrahera medelvärdet för DMSO-vehikelkontrollen från varje hålvärde för att normalisera data.
- Steg 3 Beräkna medelvärdet för referensstandardens induktionsförhållande (Ral/E2).
- Steg 4 Beräkna medelvärdet för IC₅₀-värdet för Ral/E2 och testkemikalierna.
- Steg 5 Beräkna det justerade RLU-medelvärdet för tamoxifen.
- Steg 6 Beräkna medelvärdet för E2-referensstandard.

Datatolkningskriterier

39. VM7Luc ER TA är avsett att ingå i en sammanvägd bedömning för att underlätta prioritering av ämnen för ED-testning in vivo. Ett led i detta prioriteringsförfarande är att klassificera testkemikalien som positiv eller negativ för antingen ER-agonistisk eller ER-antagonistisk aktivitet. De positiva och negativa beslutskriterier som används i valideringsstudien för VM7Luc ER TA beskrivs i tabell 1.

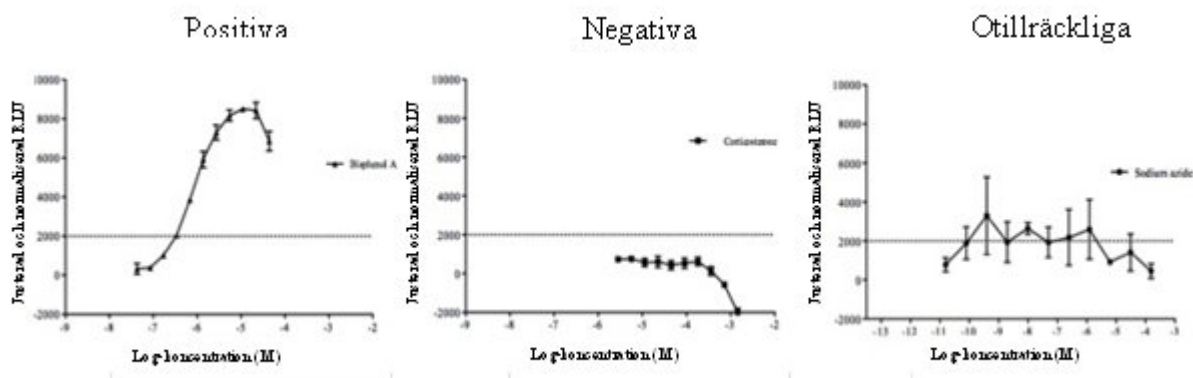
Tabell 1: Positiva och negativa beslutskriterier

AGONISTISK AKTIVITET	
Positiv	- Alla testkemikalier som har klassificerats som <i>positiva för</i> ER-agonistisk aktivitet bör ha en koncentrationsresponskurva som består av en baslinje som följs av en positiv lutning och avslutas i en platå eller topp. I vissa fall är det endast möjligt att fastställa två av dessa egenskaper (baslinje–lutning eller lutning–topp). - Den linje som anger den positiva lutningen bör innehålla minst tre punkter med ej överlappande felstaplar (medelvärde $\pm$ SD). De punkter som formar baslinjen utesluts, men den linjära delen av kurvan kan omfatta toppen eller den första punkten i platån. - En positiv klassificering kräver en responsamplitud, skillnaden mellan baslinje och topp, på minst 20 % av det maximala värdet för referensstandard E2 (dvs. 2 000 RLU eller mer när referensstandardernas [E2] värde justeras upp till 10 000 RLU). - Om möjligt bör ett EC₅₀-värde beräknas för varje positiv testkemikalie.
Negativ	Det genomsnittliga justerade RLU för en given koncentration motsvarar eller är lägre än RLU-medelvärdet för DMSO-kontrollen plus tre gånger standardavvikelsen för DMSO:s RLU.
Otillräcklig	Data som inte kan tolkas som att de visar närvaro eller avsaknad av aktivitet på grund av betydande kvalitativa eller kvantitativa begränsningar anses vara olämpliga, och kan inte användas för att fastställa om testkemikalien är positiv eller negativ. Kemikalierna bör omtestas.
ANTAGONISTISK AKTIVITET	

Positiv	- Testkemikaliens data skapar en koncentrationsresponskurva som består av en baslinje, följd av en negativ lutning. - Den linje som anger den negativa lutningen bör innehålla minst tre punkter med ej överlappande felstaplar. De punkter som formar baslinjen utesluts, men den linjära delen av kurvan kan omfatta den första punkten i platån. - Det bör finnas en reduktion på minst 20 % av aktiviteten jämfört med det maximala värdet för referensstandard Ral/E2 (dvs. 8 000 RLU eller mindre när det maximala värdet för referensstandard [Ral/E2] justeras till 10 000 RLU). - Testkemikaliens högsta icke-cytotoxiska koncentrationer bör vara lägre än eller motsvarande 1×10^{-5} M. - Om möjligt bör ett IC_{50}-värde beräknas för varje positiv testkemikalie.
Negativ	Alla datapunkter över EC_{80} -värdet (80 % av E2-responsen, eller 8 000 RLU), vid koncentrationer lägre än $1,0 \times 10^{-5}$ M.
Otillräcklig	Data som inte kan tolkas som att de visar närvaro eller avsaknad av aktivitet på grund av betydande kvalitativa eller kvantitativa begränsningar anses vara otillräckliga, och kan inte användas för att fastställa om testkemikalien är positiv eller negativ. Kemikalien bör omtestas.

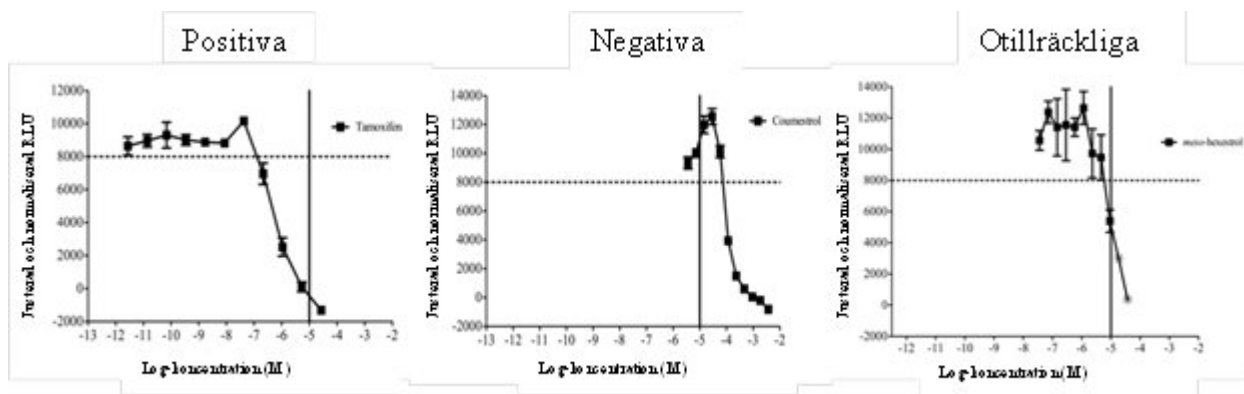
40. Positiva resultat karakteriseras av både effektens omfattning och om så är möjligt den koncentration vid vilken effekten uppstår. Exempel på positiva, negativa och otillräckliga data visas i figurerna 5 och 6.

Figur 5: Exempel på agonister – positiva, negativa och otillräckliga data



Den streckade linjen anger 20 % av E2-responsen, 2 000 justerade och normaliserade RLU.

Figur 6: Exempel på antagonister – positiva, negativa och otillräckliga data



Den

streckade linjen anger 80 % av Ral/E2-responsen, 8 000 justerade och normaliserade RLU.

Den heldragna linjen anger $1,00 \times 10^{-5}$ M. För att en respons ska anses vara positiv bör den ligga under 8 000 RLU-linjen och vid koncentrationer lägre än $1,00 \times 10^{-5}$ M.

Koncentrationer märkta med en asterisk i meso-hexestrol-diagrammet anger viabilitetspoäng på 2 eller högre.

Testresultaten för meso-hexestrol anses utgöra olämpliga data, eftersom den enda responsen under 8 000 RLU förekommer vid $1,00 \times 10^{-5}$ M.

41. Beräkningarna av EC_{50} och IC_{50} kan göras med hjälp av en Hillfunktion med fyra parametrar (se agonist- och antagonistprotokollen för närmare uppgifter (7)). Om acceptanskriterierna uppfylls innebär detta att systemet fungerar korrekt, men det säkerställer inte att en viss testomgång kommer att ge korrekta data. Att upprepa resultaten från den första testomgången är det bästa sättet att försäkra sig om att korrekta data har erhållits (se punkt 19 i "Komponenter i ER TA-testet").

TESTRAPPORT

42. Se punkt 20 i "Komponenter i ER TA-testet".

LITTERATUR

- (1) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL[®] ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- (2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, *J. Cell Biochem.*, 82(3): 467-479.
- (3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer Res.*, 58(23): 5367-5373.
- (4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β , a Modulator of ER α in the Uterus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(11): 936-5941.
- (5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), *ALTEX*, 23 (Suppl): s. 270–273.
- (6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *Alternatives to Laboratory Animals*, 33: s. 261–287.
- (7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL[®] ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication nr 11–7850.
- (8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro Mol. Toxicol.*, 13(1):67–82.
- (9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71(10):1459–1469.
- (10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chemistry and Biology*, 17(6): 646–657.

- (11) (11) Kuiper G.G., et al. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinology*, 139(10):4252–4263.
- (12) Geisinger, et al. (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280–288.
- (13) Baldwin, et al. (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649–654.
- (14) Li, Y., et al. (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, *Mol. Endo.* 28, s. 2072–2081.
- (15) Rogers, J.M. och Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, s. 67–82.

TILLÄGG 4

STABILT TRANSFEKTERAD HUMAN ÖSTROGENRECEPTOR-A – TRANSAKTIVERINGSTEST FÖR DETEKTION AV ÖSTROGENAGONISTISK OCH - ANTAGONISTISK AKTIVITET HOS KEMIKALIER MED ANVÄNDNING AV CELLINJEN ERA CALUX

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR (SE ÄVEN ALLMÄN INLEDNING)

1. Denna ER α CALUX-transaktiveringstest använder den humana U2OS-cellinjen för att detektera östrogenagonistisk och -antagonistisk aktivitet, medierad genom human östrogenreceptor alfa (hER α). Valideringsstudien av det biologiska testet Stabilt transfekterad ER α CALUX, som utfördes av BioDetection Systems BV (Amsterdam, Nederländerna), visade att denna metod är relevant och tillförlitlig för det avsedda syftet (1). Cellinjen ER α CALUX uttrycker endast stabilt transfekterad human ER α (2) (3).
2. Denna metod är särskilt utformad för att detektera hER α -medierad transaktivering genom att mäta bioluminiscens som endpoint. Bioluminiscens används ofta i biologiska tester på grund av dess höga signal-brusförhållande (4).
3. Fytoöstrogenkoncentrationer högre än 1 μ M har rapporterats överaktivera luciferasrapportgenen, vilket leder till ej receptormedierad luminiscens (5) (6) (7). Högre koncentrationer av fytoöstrogener eller andra liknande föreningar som kan överaktivera luciferasuttrycket måste därför undersökas mycket noggrant i tester med stabilt transfekterad ER-transaktivering (se tillägg 2).
4. Avsnitten ”Allmän inledning” och ”Komponenter i ER TA-testet” bör läsas innan denna testmetod används för lagstadgade ändamål. Definitioner och förkortningar som används i denna testmetod beskrivs i tillägg 1.

PRINCIPER FÖR METODEN (SE ÄVEN ALLMÄN INLEDNING)

5. DET biologiska testet används för att bedöma ligandbindning till östrogenreceptorer, följt av translokering av receptor–ligand-komplexet till kärnan. I kärnan binder receptor–ligand-komplexet specifika DNA-responselement och transaktiverar en firefly-luciferasrapportgen, vilket leder till ökat celluttryck hos luciferasenzymen. Efter tillsats av luciferassubstratet luciferin omvandlas luciferinet till en bioluminescent produkt. Det ljus som alstras kan enkelt upptäckas och kvantifieras med hjälp av en luminometer.
6. Testsystemet använder stabilt transfekterade ER α CALUX-celler. ER α CALUX-celler med ursprung från cellinjen U2OS från humant osteoblastiskt osteosarkom. Humana U2OS-celler transfekterades stabilt med 3xHRE-TATA-Luc och pSG5-neo-hER α , med användning av metoden för samfällning med kalciumfosfat. U2OS-cellinjen valdes som det den bästa

kandidaten för att fungera som östrogenresponsiv (och andra steroida hormoner) rapportcellinje, baserat på iakttagelsen att U2OS-cellinjen uppvisar låg eller ingen endogen receptoraktivitet. Frånvaron av endogena receptorer bedömdes endast med användning av luciferasrapportplasmider, som inte visade någon aktivitet när receptorligander tillsattes. Denna cellinje stödde även starka hormonmedierade responser när kognata receptorer infördes transient (2) (3) (8).

7. Testningen av kemikaliers östrogena eller antiöstrogena aktivitet med hjälp av cellinjen ER α CALUX omfattar ett förberedande test och fullständiga testomgångar. Under den förberedande testet bestäms löslighet, cytotoxicitet och ett förfinat koncentrationsintervall för testkemikalierna inför den fullständiga testningen. Under de fullständiga testomgångarna testas testkemikaliernas förfinade koncentrationsintervall i ER α CALUX-testerna, för att därefter klassificera testkemikalierna som agonistiska eller antagonistiska.
8. Datatolkningskriterierna beskrivs i detalj i punkt 59. Kortfattat anses en testkemikalie vara positiv för agonistisk aktivitet om minst två på varandra följande koncentrationer av testkemikalien visar en respons som motsvarar eller är högre än 10 % av den maximala responsen för referensstandarden 17 β -östradiol (PC₁₀). En testkemikalie anses vara positiv för antagonistisk aktivitet om minst två på varandra följande koncentrationer av testkemikalien visar en respons som motsvarar eller är lägre än 80 % av den maximala responsen för referensstandarden tamoxifen (PC₈₀).

FÖRFARANDE

Cellinjer

9. Den stabilt transfekterade cellinjen U2OS ER α CALUX bör användas i testet. Cellinjen kan erhållas från BioDetection Systems BV, Amsterdam, Nederländerna med ett tekniskt licensavtal.
10. Endast mykoplasmafria cellodlingar bör användas. De använda cellsatserna bör ha certifierats som negativa för mykoplasmaförörening. I annat fall bör ett mykoplasmatest utföras före användning. RT-PCR (*Real Time Polymerase Chain Reaktion*) bör användas för känslig detektion av mykoplasmainfektion (9).

Cellinjens stabilitet

11. För att bibehålla CALUX-cellernas stabilitet och integritet bör cellerna lagras i flytande kväve (–80 °C). När cellerna har tinats upp för att starta en ny odling bör de subkultiveras minst två gånger innan de används för att bedöma östrogenagonistisk och -antagonistisk aktivitet hos kemikalier. Cellerna bör inte subkultiveras för mer än 30 passager.
12. För att övervaka cellinjens stabilitet över tiden bör det agonistiska och antagonistiska testsystemets respons kontrolleras genom en utvärdering av referensstandardens värden EC₅₀ eller IC₅₀. Dessutom bör det positiva och det negativa kontrollurvalets relativa induktion

övervakas. Resultaten bör överensstämma med acceptanskriterierna för det agonistiska (tabell 3C) eller det antagonistiska ER α CALUX-biotestet (tabell 4C). Referensstandarder och positiva och negativa kontroller anges i tabellerna 1 och 2 för den agonistiska respektive antagonistiska varianten.

Betingelser för cellodling och överföring till platta

13. U2OS-cellerna bör odlas i ett odlingsmedium (DMEM/F12 (1:1) med fenolrött som pH-indikator, kompletterat med fetalt bovinserum (7,5 %), icke-essentiella aminosyror (1 %), 10 enheter/ml penicillin, streptomycin och geneticin (G-418) som urvalsmarkör). Cellerna bör placeras i en CO₂-inkubator (5 % CO₂) vid 37 °C och 100 % luftfuktighet. När cellerna når en konfluens på 85–95 % bör de antingen subkultiveras eller beredas för sådd i 96-håls mikrotiterplattor. I det senare fallet bör cellerna resuspenderas vid 1×10^5 celler/ml i ett östrogenfritt testmedium (DMEM/F12 (1:1) utan fenolrött, kompletterat med dextranbelagt träkol som behandlats med fetalt bovinserum (5 % v/v), icke-essentiella aminosyror (1 %) och 10 enheter/ml penicillin, streptomycin) och överförs till 96-hålsplattorna (100 μ l homogeniserad cellsuspension). Cellerna bör förinkuberas i en CO₂-inkubator (5 % CO₂, 37 °C, 100 % luftfuktighet) i 24 timmar före exponering. Plasten bör vara östrogenfri.

Acceptanskriterier

14. Testkemikaliernas agonistiska och antagonistiska aktivitet testas i serier. En testserie består av högst sex mikrotiterplattor. Varje testserie består av minst en hel serie av utspädningar av en referensstandard, ett positivt kontrollprov, ett negativt kontrollprov och lösningsmedelskontroller. I figurerna 1 och 2 beskrivs beredningen av plattor för agonistiska och antagonistiska testserier.
15. Varje utspädning av referensstandarderna, testkemikalierna, alla lösningsmedelskontroller samt de positiva och negativa kontrollerna bör analyseras i triplikat. Varje triplikatanalys bör uppfylla kraven i tabellerna 3A och 4A.
16. En komplett serie av utspädningar av referensstandarderna (17 β -östradiol för agonistisk aktivitet, tamoxifen för antagonistisk aktivitet) mäts på den första plattan i varje testserie. För att kunna jämföra analysresultaten för de återstående fem mikrotiterplattorna med den första mikrotiterplattan som innehåller referensstandardens fullständiga koncentrationsresponskurva bör alla plattor innehålla tre kontrollprover: lösningsmedelskontroll, den högsta koncentrationen av den testade referensstandarderna och approximativ koncentration av EC₅₀ (agonistisk aktivitet) eller IC₅₀ (antagonistisk aktivitet) för referensstandarderna. Förhållandet mellan de genomsnittliga kontrollproverna för den första plattan och de återstående fem plattorna bör uppfylla de krav som anges i tabell 3C (agonistisk aktivitet) eller tabell 4C (antagonistisk aktivitet).
17. Z-faktorn beräknas för varje mikrotiterplatta inom en testserie (10). Z-faktorn bör beräknas med användning av responsen vid referensstandardens högsta och lägsta koncentration. En

mikrotiterplatta anses giltig om den uppfyller kraven i tabell 3C (agonistisk aktivitet) eller tabell 4C (antagonistisk aktivitet).

18. Referensstandarden bör uppvisa en S-formad dosresponskurva. Det EC₅₀- eller IC₅₀-värde som härleds från responsen på en serie utspädningar av referensstandarden bör uppfylla kraven i tabell 3C (agonistisk aktivitet) eller tabell 4C (antagonistisk aktivitet).
19. Varje testserie bör innehålla ett positivt och ett negativt kontrollprov. Den beräknade relativa induktionen både för det positiva och det negativa kontrollprovet bör uppfylla kraven i tabell 3C (agonistisk aktivitet) eller tabell 4C (antagonistisk aktivitet).
20. Under alla mätningar bör induktionsfaktorn för referensstandardens högsta koncentration mätas genom att den genomsnittligt högsta RLU-responsen för referensstandardens 17β-östradiol divideras med referenslösningens medelskontrollens genomsnittliga RLU-respons. Denna induktionsfaktor bör uppfylla kraven för x-faldig induktion i tabell 3C (agonistisk aktivitet) eller tabell 4C (antagonistisk aktivitet).
21. Endast mikrotiterplattor som uppfyller samtliga ovannämnda acceptanskriterier anses giltiga och kan användas för att utvärdera testkemikaliernas respons.
22. Acceptanskriterierna är tillämpliga både på det förberedande testet och de fullständiga testomgångarna.

Tabell 1: Koncentrationer av referensstandardens samt positiv kontroll och negativ kontroll för det agonistiska CALUX-testet

	Ämne	CAS-nr	Testintervall (M)
Referensstandard	17β-östradiol	50-28-2	1,0*10 ⁻¹³ – 1,0*10 ⁻¹⁰
Positiv kontroll (PC)	17α-metylttestosteron	58-18-4	3,0*10 ⁻⁰⁶
Negativ kontroll (NC)	kortikosteron	50-22-6	1,0*10 ⁻⁰⁸

Tabell 2: Koncentrationer av referensstandardens samt positiv kontroll och negativ kontroll för det antagonistiska CALUX-testet

	Ämne	CAS-nr	Testintervall (M)
Referensstandard	tamoxifen	10540-29-1	3,0*10 ⁻⁰⁹ – 1,0*10 ⁻⁰⁵
Positiv kontroll (PC)	4-hydroxitamoxifen	68047-06-3	1,0*10 ⁻⁰⁹
Negativ kontroll (NC)	resveratrol	501-36-0	1,0*10 ⁻⁰⁵

Tabell 3: Acceptanskriterier för det agonistiska ERα CALUX-testet

A – individuella prov på platta		Kriterium
1	Maximal % SD för triplikathål (för negativ kontroll, positiv kontroll, kemikalie och referensstandard, förutom C0)	< 15 %
2	Maximal % SD för triplikathål (för referensstandard och testkemikaliens lösningsmedelskontroller (C0, SC))	< 30 %
3	Maximalt LDH-läckage, som ett mått på cytotoxicitet.	< 120 %
B – inom en enskild mikrotiterplatta		
4	Förhållande för referensstandardens lösningsmedelskontroll (C0, platta 1) och testkemikaliens lösningsmedelskontroll (SC, plattorna 2 till x)	0,5 till 2,0
5	Förhållande för appr. EC50 och de högsta referensstandardkoncentrationerna på platta 1 samt appr. EC50 och de högsta referensstandardkoncentrationerna på plattorna 2 till x (C4, C8)	0,70 till 1,30
6	Z-faktor för varje platta	> 0,6
C – inom en enskild analysserie (samtliga plattor i en serie)		
7	S-kurva för referensstandard	Ja (17β-östradiol)
8	EC50-förhållande för referensstandard 17β-östradiol	4*10 ⁻¹² – 4*10 ⁻¹¹ M
9	Minsta induktionsförhållande för den högsta koncentrationen av 17β-östradiol med avseende på referensstandardens	5
10	Relativ induktion (%) PC.	> 30 %
11	Relativ induktion (%) NC.	< 10 %

Appr.: approximativ. PC: positiv kontroll. NC: negativ kontroll. SC: testkemikaliens lösningsmedelskontroll. C0: referensstandardens lösningsmedelskontroll. SD: standardavvikelse. LDH: laktatdehydrogenas.

Tabell 4: Acceptanskriterier för det antagonistiska ERα CALUX-testet

A – individuella prov på platta		Kriterium
1	Maximal % SD för triplikathål (för negativ kontroll, positiv kontroll, kemikalie och referensstandard, lösningsmedelskontroll C0))	< 15 %
2	Maximal % SD för triplikathål (för vehikelkontroll och högsta referensstandardkoncentration (C8))	< 30 %
3	Maximalt LDH-läckage, som ett mått på cytotoxicitet.	< 120 %

B – inom en enskild mikrotiterplatta

4	Förhållande för referensstandardens lösningsmedelskontroll (C0, platta 1) och testkemikaliens lösningsmedelskontroll (SC, plattorna 2 till x)	0,70 till 1,30
5	Förhållande för appr. referensstandardkoncentrationer för IC50 på platta 1 samt appr. IC50-referensstandardkoncentrationer för IC50 på plattorna 2 till x (C4)	0,70 till 1,30
6	Förhållande för de högsta referensstandardkoncentrationerna på platta 1 och de högsta referensstandardkoncentrationerna på plattorna 2 till x (C8)	0,50 till 2,0
7	Z-faktor för varje platta	> 0,6

C – inom en enskild analysserie (samtliga plattor i en serie)

8	S-kurva för referensstandard	Ja (tamoxifen)
9	IC50-förhållande för referensstandard (tamoxifen)	$1 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-7}$ M
10	Minsta induktionsförhållande för referensstandardens lösningsmedelskontroll med avseende på den högsta tamoxifenkoncentrationen.	2,5
11	Relativ induktion (%) PC.	< 70 %
12	Relativ induktion (%) NC.	> 85 %

Appr.: approximativ. PC: positiv kontroll. NC: negativ kontroll. VC: vehikelkontroll (lösningsmedelskontroll utan fast koncentration av den agonistiska referensstandard). SC: testkemikaliens lösningsmedelskontroll. C0: referensstandardens lösningsmedelskontroll. SD: standardavvikelse. LDH: laktatdehydrogenas.

Lösningsmedels-/vehikelkontroll, referensstandarder, positiva kontroller, negativa kontroller

23. Samma lösningsmedels-/vehikelkontroll, referensstandarder och positiva och negativa kontroller bör användas både för det förberedande testet och de fullständiga testomgångarna. Dessutom bör koncentrationen av referensstandarder och positiva och negativa kontroller vara desamma.

Lösningssmedelskontroll

24. Det lösningsmedel som används för att lösa upp testkemikalierna bör användas som lösningsmedelskontroll. Dimetylsulfoxid (DMSO, 1 % (v/v), CAS-nr 67-68-5) användes som vehikel under valideringen av ER α CALUX-testet. Om ett annat lösningsmedel än DMSO används bör alla referensstandarder, kontroller och testkemikalier testas i samma vehikel. Observera att lösningsmedelskontrollen för antagonistiska studier innehåller en fast koncentration av den agonistiska referensstandard 17 β -östradiol (ungefär EC₅₀-koncentration). En vehikelkontroll bör beredas och testas för att testa det lösningsmedel som används för antagonistiska studier.

Vehikelkontroll (antagonistisk aktivitet)

25. För att testa antagonistisk aktivitet kompletteras testmediet med en fast koncentration av den agonistiska referensstandard 17 β -östradiol (ungefär EC₅₀-koncentration). För att testa det lösningsmedel som använts för att lösa upp testkemikalierna i antagonisttestet, bör ett testmedium utan fast koncentration av den agonistiska referensstandard 17 β -östradiol beredas. Detta kontrollprov utgör vehikelkontrollen. Dimetylsulfoxid (DMSO, 1 % (v/v), CAS-nr 67-68-5) användes som vehikel under valideringen av ER α CALUX-testet. Om ett annat lösningsmedel än DMSO används bör alla referensstandarder, kontroller och testkemikalier testas i samma vehikel.

Referensstandarder

26. Den agonistiska referensstandard är 17 β -östradiol (tabell 1). Referensstandarderna består av seriespädningar av åtta koncentrationer av 17 β -östradiol ($1,0 \cdot 10^{-13}$, $3,0 \cdot 10^{-13}$, $1,0 \cdot 10^{-12}$, $3,0 \cdot 10^{-12}$, $6,0 \cdot 10^{-12}$, $1,0 \cdot 10^{-11}$, $3,0 \cdot 10^{-11}$, $1,0 \cdot 10^{-10}$ M).
27. Den antagonistiska referensstandard är tamoxifen (tabell 2). Referensstandarderna består av seriespädningar av åtta koncentrationer av tamoxifen ($3,0 \cdot 10^{-9}$, $1,0 \cdot 10^{-8}$, $3,0 \cdot 10^{-8}$, $1,0 \cdot 10^{-7}$, $3,0 \cdot 10^{-7}$, $1,0 \cdot 10^{-6}$, $3,0 \cdot 10^{-6}$, $1,0 \cdot 10^{-5}$ M). Varje koncentration av den agonistiska referensstandard saminkuberas med en fast koncentration av den agonistiska referensstandard 17 β -östradiol ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Positiv kontroll

28. Den positiva kontrollen för agonistiska studier är 17 α -metyltestosteron (tabell 1).
29. Den positiva kontrollen för antagonistiska studier är 4-hydroxitamoxifen (tabell 2). Den antagonistiska positiva kontrollen saminkuberas med en fast koncentration av den agonistiska referensstandard 17 β -östradiol ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Negativ kontroll

30. Den negativa kontrollen för agonistiska studier är kortikosteron (tabell 1).
31. Den negativa kontrollen för antagonistiska studier är resveratrol (tabell 2). Den antagonistiska negativa kontrollen saminkuberas med en fast koncentration av den agonistiska referensstandarden 17β -östradiol ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Demonstration av laboratoriets kompetens (se punkt 14 och tabellerna 3 och 4 i ”Komponenter i ER TA-TESTET” I DENNA TESTMETOD)

Vehikel

32. Det lösningsmedel som används för att lösa upp testkemikalierna bör lösa upp testkemikalien fullständigt och bör vara blandbart med cellmediet. DMSO, vatten och etanol (renhetsgrad 95 % till 100 %) är lämpliga lösningsmedel. Om DMSO används som lösningsmedel bör den maximala koncentrationen av DMSO under inkubationen inte överskrida 1 % (v/v). Före användning bör lösningsmedlet testas för att kontrollera att det inte är cytotoxiskt och inte stör testet.

Beredning av referensstandarder, positiva kontroller, negativa kontroller och testkemikalier

33. Referensstandarder, positiva kontroller, negativa kontroller och testkemikalier löses upp i 100 % DMSO (eller ett annat lämpligt lösningsmedel). Lämpliga (serie)spädningar bör sedan beredas i samma lösningsmedel. Innan de löses upp bör alla ämnen få anta rumstemperatur. Färska stamlösningar eller referensstandarder, positiva kontroller, negativa kontroller och testkemikalier bör inte ha märkbara fällningar eller grumlighet. Referensstandarden och kontrollstammarna kan beredas i bulk. Nya stamlösningar av testkemikalierna bör beredas före varje försök. Nya slutliga utspädningar av referensstandarderna, de positiva kontrollerna, de negativa kontrollerna och testkemikalierna bör dock beredas för varje försök och användas inom 24 timmar från beredningen.

Löslighet, cytotoxicitet och koncentrationsintervall

34. Under det förberedande testet fastställs testkemikaliernas löslighet i det valda lösningsmedlet. En maximal stamkoncentration på 0,1 M bereds. Om denna koncentration visar löslighetsproblem bör lägre stamlösningar beredas till dess att testkemikalierna är fullständigt upplösta. Under det förberedande testet testas seriespädningar på 1:10 av testkemikalien. Den maximala testkoncentrationen för agonistisk eller antagonistisk testning är 1 mM. Efter det förberedande testet härleds ett lämpligt förfinat koncentrationsintervall för testkemikalierna som bör testas under de fullständiga testomgångarna. De utspädningar som används för fullständig testning bör vara 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1 000x och 3 000x.
35. Cytotoxicitetstestning ingår i protokollet för den agonistiska och den antagonistiska testmetoden (11). Cytotoxicitetstestning ingår dessutom både i det förberedande testet och de fullständiga testomgångarna. Den metod som användes för att bedöma cytotoxicitet under

valideringen av ER α CALUX-testet var läckagetestet för laktatdehydrogenas (LDH) i kombination med en kvalitativ visuell inspektion av cellerna (se tillägg 4.1) och följt av exponering för textkemikalierna. Andra kvantitativa metoder kan dock användas för att bestämma cytotoxicitet (t.ex. tetrazoliumbaserat kolorimetriskt test (MTT) eller CALUX-test av cytotoxicitet). Generellt anses testkemikaliekoncentrationer som visar mer än 20 % reduktion av cellviabiliteten vara cytotoxiska och kan därför inte användas för datautvärdering. När det gäller LDH-läckagetest anses testkemikaliens koncentration vara cytotoxisk om procentandelen LDH-läckage är högre än 120 %.

Testkemikaliens exponering och beredning av testplattor

36. Efter trypsinering av en konfluent kolv med odlade celler resuspenderas cellerna vid 1×10^5 celler/ml i ett östrogenfritt testmedium 100 μ l av resuspenderade celler överförs till de inre hålen på en 96-håls mikrotiterplatta. De yttre hålen fylls med 200 μ l fosfatbuffrad saltlösning (PBS) (se figurerna 1 och 2). De överförda cellerna förinkuberas i 24 timmar i en CO₂-inkubator (5 % CO₂, 37 °C, 100 % luftfuktighet).
37. Efter förinkuberingen inspekteras cellerna för att kontrollera om det finns någon synlig cytotoxicitet (se tillägg 4.1), kontamination eller konfluens. Endast plattor som inte visar någon synlig cytotoxicitet eller kontamination och har minst 85 % konfluens används för testningen. Mediet från de inre hålen avlägsnas försiktigt och ersätts med 200 μ l östrogenfritt testmedium som innehåller lämpliga spädningsserier av referensstandarderna, testkemikalierna, de positiva kontrollerna, de negativa kontrollerna och lösningsmedelskontrollerna (tabell 5: agonistiska studier, Tabell 6: antagonistiska studier). Alla referensstandarder, testkemikalier, positiva kontroller, negativa kontroller och lösningsmedelskontroller testas i triplikat. Plattans utformning för agonistisk testning anges i figur 1. Plattans utformning för antagonistisk testning anges i figur 2. Plattorna för förberedande test och fullständig testning utformas på identiskt sätt. För antagonistisk testning innehåller alla inre hål, förutom hålen för vehikelkontroll, även en fast koncentration av den agonistiska referensstandard 17 β -östradiol ($3,0 \times 10^{-12}$ M). Observera att referensstandarderna C8 och C4 bör tillsättas varje TC-platta.
38. När cellerna har exponerats för alla kemikalier bör de 96-håls mikrotiterplattorna inkuberas i ytterligare 24 timmar i en CO₂-inkubator (5 % CO₂, 37 °C, 100 % luftfuktighet).

Figur 1: Utformning av 96-håls mikrotiterplattor för förberedande test och bedömning av agonistisk effekt.

Platta 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	

H												

Efterföljande plattor

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = referensstandardens lösningsmedel.

C(1-8) = referensstandardens spädningsserier (1-8, låga-till-höga koncentrationer).

PC = positiv kontroll.

NC = negativ kontroll.

TCx-(1-8) = spädningsar (1-8, låga till höga koncentrationer) av testkemikalien för det förberedande testet samt bedömning av den agonistiska effekten hos testkemikalie x.

SC = lösningsmedelskontroll av testkemikalien (helst samma lösningsmedel som i C0, men eventuellt från en annan sats).

Grå celler: = Yttre hål, fyllda med 200 µl PBS.

Figur 2: Utformning av 96-håls mikrotiterplattor för förberedande test och bedömning av antagonistisk effekt.

Platta 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Efterföljande plattor

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = referensstandardens lösningsmedel.

- C(1-8) = referensstandardens spädningsserier (1–8, låga-till-höga koncentrationer).
- NC = negativ kontroll.
- PC = positiv kontroll.
- TCx-(1-8) = spädningar (1–8, låga till höga koncentrationer) av testkemikalien för det förberedande testet samt bedömning av den agonistiska effekten hos testkemikalie x.
- SC = lösningsmedelskontroll av testkemikalien (helst samma lösningsmedel som i C0, men eventuellt från en annan sats).
- VC = vehikelkontroll (lösningsmedelskontroll utan fast koncentration av den agonistiska referensstandard 17β-östradiol).
- Grå celler: = Yttre hål, fyllda med 200 µl PBS.
- Anmärkning: alla inre hål, utom hålen för vehikelkontroll, innehåller också en fast koncentration av den agonistiska referensstandard 17β-östradiol ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Mätning av luminiscens

39. Luminiscensmätningen beskrivs i detalj i protokollet för den agonistiska och den antagonistiska testmetoden (10). Mediet bör avlägsnas från hålen och cellerna bör lyseras efter 24 timmars inkubation för att öppna cellmembranet och möjliggöra mätning av luciferasaktiviteten.
40. För luminiscensmätningen kräver detta förfarande en luminometer som är utrustad med två injektorer. Luciferasreaktionen utlöses genom injektion av substratet luciferin. Reaktionen stoppas genom tillsats av 0,2 M NaOH. Reaktionen stoppas för att förebygga att luminiscens överförs från ett hål till ett annat.
41. Det ljus som släpps ut från varje hål uttrycks som relativa ljusenheter (RLU) från varje hål.

Förberedande test

42. Analysresultaten från det förberedande testet används för att bestämma ett förfinat koncentrationsintervall för testkemikalierna inför den fullständiga testningen. Utvärdering av resultaten från det förberedande testet och bestämning av det förfinade koncentrationsintervallet för testkemikalier för fullständig testning beskrivs detaljerat i protokollet för den agonistiska och den antagonistiska testmetoden (10). Här ges endast en kort sammanfattning av förfarandena för att bestämma testkemikaliernas koncentrationsintervall för agonistisk och antagonistisk testning. Vägledning för utformningen av seriespädningar ges i tabellerna 5 och 6.

Val av koncentrationer för bedömning av agonistiska effekter

43. Under det förberedande testet bör testkemikalierna testas med användning av de seriespädningar som anges i tabell 5 (agonistisk testning) och 6 (antagonistisk testning). Alla koncentrationer bör testas i triplikathål enligt den utformning av plattorna som ges i figur 1 (agonistisk testning) respektive figur 2 (antagonistisk testning).
44. Endast analysresultat som uppfyller acceptanskriterierna (tabell 3) anses giltiga och kan användas för att utvärdera testkemikaliernas respons. Om en eller flera mikrotiterplattor i en

analysserie inte uppfyller acceptanskriterierna bör de respektive mikrotiterplattorna analyseras igen. Om den första plattan som innehåller den fullständiga serien av spädningar av referensstandarderna inte uppfyller acceptanskriterierna måste hela testserien (sex plattor) analyseras igen.

45. Testkemikaliernas ursprungliga koncentrationsintervall bör justeras och det förberedande testet bör upprepas i följande fall:

- Om cytotoxicitet observeras. Det förberedande testet bör upprepas med lägre icke-cytotoxiska koncentrationer av testkemikalien.
- Om det förberedande testet av testkemikalien inte visar en fullständig dosresponskurva på grund av att de testade kemikalierna genererar maximal induktion. Det förberedande testet bör upprepas med lägre koncentrationer av testkemikalien.

46. När en giltig dosrelaterad respons observeras bör den (lägsta) koncentration vid vilken maximal induktion observeras och inte visar cytotoxicitet väljas. Den högsta koncentrationen av den testkemikalie som ska testas i de fullständiga testomgångarna bör vara tre gånger denna valda koncentration.

47. En fullständig förfinad spädningsserie av testkemikalien bör beredas med de utspädningssteg som anges i tabell 5, med start vid den högsta koncentration som fastställts enligt ovan.

48. En testkemikalie som inte framkallar någon agonistisk effekt bör testas i de fullständiga testomgångarna, med start vid den högsta icke-cytotoxiska koncentration som identifierats under det förberedande testet.

Val av koncentrationer för bedömning av antagonistiska effekter

49. Endast analysresultat som uppfyller acceptanskriterierna (tabell 4) anses giltiga och kan användas för att utvärdera testkemikaliernas respons. Om en eller flera mikrotiterplattor i en analysserie inte uppfyller acceptanskriterierna bör de respektive mikrotiterplattorna analyseras igen. Om den första plattan som innehåller den fullständiga serien av spädningar av referensstandarderna inte uppfyller acceptanskriterierna måste hela testserien (sex plattor) analyseras igen.

50. Testkemikaliernas ursprungliga koncentrationsintervall bör justeras och det förberedande testet bör upprepas i följande fall:

- Om cytotoxicitet observeras. Det förberedande testet bör upprepas med lägre icke-cytotoxiska koncentrationer av testkemikalien.
- Om det förberedande testet av testkemikalien inte visar en fullständig dosresponskurva på grund av att de testade kemikalierna genererar maximal inhibering. Det förberedande testet bör upprepas med lägre koncentrationer av testkemikalien.

51. När en giltig dosrelaterad respons påvisas bör den (lägsta) koncentration vid vilken maximal inhibering observeras och inte visar cytotoxicitet väljas. Den högsta koncentrationen av den testkemikalie som ska testas i de fullständiga testomgångarna bör vara tre gånger denna valda koncentration.
52. En fullständig förfinad spädningsserie av testkemikalien bör beredas med de utspädningssteg som anges i tabell 6, med start vid den högsta koncentration som fastställts enligt ovan.
53. Testkemikalier som inte framkallar några antagonistisk effekter bör testas i de fullständiga testomgångarna, med start vid den högsta icke-cytotoxiska koncentration som testats under det förberedande testet.

Fullständiga testomgångar

54. När de förfinade koncentrationsintervallen har valts bör testkemikalierna testas fullständigt med användning av de spädningsserier som anges i tabell 5 (antagonistisk analys) och 6 (antagonistisk analys). Alla koncentrationer bör testas i tripplikathåll enligt den utformning av plattorna som ges i figur 1 (agonistisk testning) respektive figur 2 (antagonistisk testning).
55. Endast analysresultat som uppfyller acceptanskriterierna (tabellerna 3 och 4) anses giltiga och kan användas för att utvärdera testkemikaliernas respons. Om en eller flera mikrotiterplattor i en analysserie inte uppfyller acceptanskriterierna bör de respektive mikrotiterplattorna analyseras igen. Om den första plattan som innehåller den fullständiga serien av spädningar av referensstandarden inte uppfyller acceptanskriterierna måste hela testserien (sex plattor) analyseras igen.

Tabell 5: Koncentrationer och utspädningar av de referensstandarder, kontroller och testkemikalier som används för agonistisk testning

Referens 17 β - östradiol konc. (M)		TCx – förberedande test utspädning		TCx – fullständig testomgång utspädning		Kontroller konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	3,0*10 ⁻⁰⁶
C1	1,0*10 ⁻¹³	TCx-2	1 000,000 x	TCx-2	1 000 x	NC	1,0*10 ⁻⁰⁸
C2	3,0*10 ⁻¹³	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	1,0*10 ⁻¹²	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	3,0*10 ⁻¹²	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	6,0*10 ⁻¹²	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	1,0*10 ⁻¹¹	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	3,0*10 ⁻¹¹	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	1,0*10 ⁻¹⁰						

TCx – testkemikalie x

PC – positiv kontroll (17 α -metyltestosteron)

NC –negativ kontroll (kortikosteron)

C0 – referensstandardens lösningsmedelskontroll

SC – testkemikaliens lösningsmedelskontroll

Tabell 6: Koncentrationer och utspädningar av de referensstandarder, kontroller och testkemikalier som används för antagonistisk testning

Referenstamoxifen konc. (M)		TCx – förberedande test utspädning		TCx – fullständig testomgång utspädning		Kontroller konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	1,0*10 ⁻⁰⁹
C1	3,0*10 ⁻⁰⁹	TCx-2	1 000,000 x	TCx-2	1 000 x	NC	1,0*10 ⁻⁰⁵
C2	1,0*10 ⁻⁰⁸	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	3,0*10 ⁻⁰⁸	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	1,0*10 ⁻⁰⁷	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x	Kompletterad agonist konc. (M)	
C5	3,0*10 ⁻⁰⁷	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	1,0*10 ⁻⁰⁶	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	3,0*10 ⁻⁰⁶	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β- östradiol	3,0*10 ⁻¹²
C8	1,0*10 ⁻⁰⁵						

TCx – testkemikalie x

PC – positiv kontroll (4-hydroxitamoxifen)

NC – negativ kontroll (resveratrol)

C0 – referensstandardens lösningsmedelskontroll

SC – testkemikalies lösningsmedelskontroll

VC – vehikelkontroll (innehåller ingen fast koncentration av den agonistiska referensstandard 17β-östradiol (3,0*10⁻¹² M))

Insamling av data och dataanalys

56. Efter det förberedande testet och den fullständiga testomgångarna bör testkemikalies EC₁₀, EC₅₀, PC₁₀, PC₅₀ och maximala induktion (TCx_{max}) bestämmas för agonistisk testning. För antagonistisk testning bör IC₂₀, IC₅₀, PC₈₀, PC₅₀ och minimal induktion (TCx_{min}) beräknas. En grafisk återgivning av dessa parametrar ges i figur 3 (agonistisk aktivitet) och figur 4 (antagonistisk aktivitet). De parametrar som behövs beräknas baserat på varje testkemikalies relativa induktion (i förhållande till referensstandardens maximala induktion (= 100 %)). Icke-linjär regression (variabel lutning, fyra parametrar) bör användas för datautvärderingen, enligt följande ekvation:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{(1 + 10^{((lgEC_{50} - X) * Hill Slope)})}$$

Där

X = Log av dos eller koncentration

Y = Respons (relativ induktion (%))

Top = Maximal induktion (%)

Bottom = Minimal induktion (%)

LogEC_{50} = log av koncentration vid vilken 50 % av den maximala responsen observeras.

HillSlope = lutningsfaktor för HillSlope.

57. Rådata från luminometern, uttryckt som relativa ljusenheter (RLU), bör överföras till det kalkylblad för dataanalysen som har utformats för det förberedande testet och de fullständiga testomgångarna. Rådatan bör uppfylla de acceptanskriterier som anges i tabellerna 3A och 3B (agonistisk analys) respektive tabellerna 4A och 4B (antagonistisk analys). Om rådatan uppfyller acceptanskriterierna utförs följande beräkningssteg för att bestämma de parametrar som behövs:

Agonistisk analys

- Subtrahera genomsnittlig RLU för referensstandardens lösningsmedelskontroll från varje råanalysdata för referensstandarderna.
- Subtrahera genomsnittlig RLU för testkemikaliens lösningsmedelskontroll från varje råanalysdata för testkemikalierna.
- Beräkna den relativa induktionen från varje koncentration av referensstandard. Sätt induktionen för den högsta koncentrationen av referensstandard till 100 %.
- Beräkna den relativa induktionen för varje koncentration av testkemikalien jämfört med den högsta koncentrationen av referensstandard som 100 %.
- Utvärdera analysresultaten enligt icke-linjär regression (variabel lutning, fyra parametrar).
- Bestäm EC_{50} och EC_{10} för referensstandard.
- Bestäm EC_{50} och EC_{10} för testkemikalierna.
- Bestäm den högsta relativa induktionen för testkemikalien (TC_{max}).
- Bestäm PC_{10} och PC_{50} för testkemikalierna.

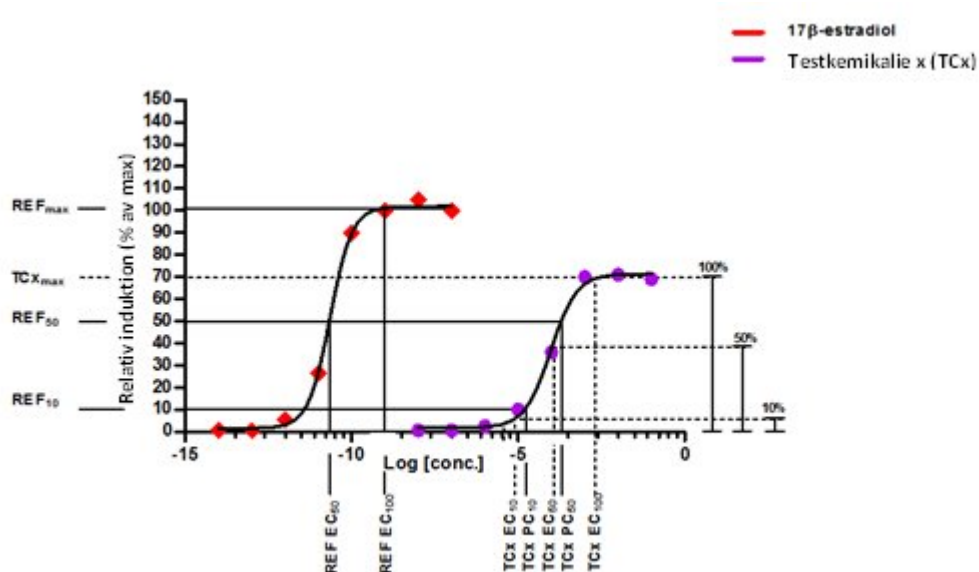
För testkemikalier är det kanske inte alltid möjligt att erhålla en fullständig dosresponskurva, t.ex. på grund av problem med cytotoxicitet eller löslighet. Det innebär i sin tur att EC_{50} , EC_{10} och PC_{50} inte kan bestämmas. I sådana fall kan endast PC_{10} och TC_{max} bestämmas.

Antagonistisk analys

- Subtrahera genomsnittlig RLU för den högsta koncentrationen av referensstandard från varje råanalysdata för referensstandarderna.
- Subtrahera genomsnittlig RLU för referensstandardens lösningsmedelskontroll från varje råanalysdata för testkemikalierna.
- Beräkna den relativa induktionen från varje koncentration av referensstandard. Sätt induktionen för den lägsta koncentrationen av referensstandard till 100 %.

- Beräkna den relativa induktionen för varje koncentration av testkemikalien jämfört med den lägsta koncentrationen av referensstandard som 100 %.
- Utvärdera analysresultaten enligt icke-linjär regression (variabel lutning, fyra parametrar).
- Bestäm IC_{50} och IC_{20} för referensstandard.
- Bestäm IC_{50} och IC_{20} för testkemikalierna.
- Bestäm den lägsta relativa induktionen för testkemikalien (TC_{min}).
- Bestäm PC_{80} och PC_{50} för testkemikalierna.

Figur 3: Översikt över parametrar som bestäms i det agonistiska testet



EC_{10} = koncentration av ett ämne vid vilken 10 % av dess maximala respons observeras.

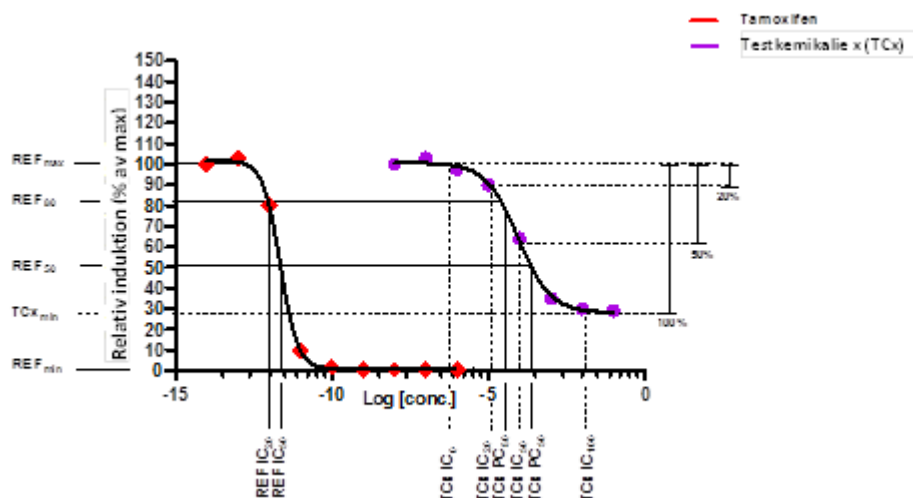
EC_{50} = koncentration av ett ämne vid vilken 50 % av dess maximala respons observeras.

PC_{10} = koncentration av en testkemikalie vid vilken dess respons motsvarar referensstandardens EC_{10} .

PC_{50} = koncentration av en testkemikalie vid vilken dess respons motsvarar referensstandardens EC_{50} .

TC_{xmax} = testkemikaliens maximala relativa induktion.

Figur 4: Översikt över parametrar som bestäms i det antagonistiska testet



IC₂₀

= koncentration av ett ämne vid vilken 80 % av dess maximala respons observeras (20 % inhibition).

IC₅₀ = koncentration av ett ämne vid vilken 50 % av dess maximala respons observeras (50 % inhibition).

PC₈₀ = koncentration av en testkemikalie vid vilken dess respons motsvarar referensstandardens IC₂₀.

PC₅₀ = koncentration av en testkemikalie vid vilken dess respons motsvarar referensstandardens IC₅₀.

TC_{xmin} = testkemikalins minimala relativa induktion.

För testkemikalier är det kanske inte alltid möjligt att erhålla en fullständig dosresponskurva, t.ex. på grund av problem med cytotoxicitet eller löslighet. Följaktligen kan IC₅₀, IC₂₀ och PC₅₀ inte fastställas. I sådana fall kan endast PC₂₀ och TC_{min} bestämmas.

58. Resultaten bör baseras på två (eller tre) oberoende testomgångar. Om två testomgångar ger jämförbara och därför reproducerbara resultat är det inte nödvändigt att köra en tredje runda. För att vara godtagbara bör resultaten

- uppfylla acceptanskriterierna (se Acceptanskriterier, punkterna 14–22),
- vara reproducerbara.

Datatolkningskriterier

59. Följande kriterier ska användas för datatolkning och beslut om huruvida en testkemikalie anses vara positiv eller negativ:

Agonistisk analys

För varje fullständig testomgång anses en testkemikalie vara **positiv** om

- 1 TC_{max} motsvarar eller överskrider 10 % av referensstandardens maximala respons

(REF₁₀),

- 2 minst två på varandra följande koncentrationer av testkemikalien motsvarar eller överskrider REF₁₀.

För varje fullständig testomgång anses en testkemikalie vara **negativ** om

- 1 TC_{max} inte motsvarar eller överskrider 10 % av referensstandardens maximala respons (REF₁₀).
- 2 mindre än två på varandra följande koncentrationer av testkemikalien motsvarar eller överskrider REF₁₀.

Antagonistisk analys

För varje fullständig testomgång anses en testkemikalie vara **positiv** om

- 1 TC_{min} motsvarar eller är lägre än 80 % av referensstandardens maximala respons (REF₈₀ = 20 % inhibition).
- 2 minst två på varandra följande koncentrationer av testkemikalien motsvarar eller är lägre än REF₈₀.

För varje fullständig testomgång anses en testkemikalie vara **negativ** om

- 1 TC_{min} överskrider 80 % av referensstandardens maximala respons (REF₈₀ = 20 % inhibition),
- 2 mindre än två på varandra följande koncentrationer av testkemikalien motsvarar eller är lägre än REF₈₀.

60. För att karakterisera potensen hos den positiva responsen från en testkemikalie bör effektens omfattning (agonistisk analys TC_{max}, antagonistisk analys TC_{min}) samt den koncentration vid vilken effekten uppstår (agonistisk analys EC₁₀, EC₅₀, PC₁₀, PC₅₀. antagonistisk analys IC₂₀, IC₅₀, PC₈₀, PC₅₀) rapporteras.

TESTRAPPORT

61. Se punkt 20 i ”Komponenter i ER TA-testet”.

LITTERATUR

- (1) OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ER α CALUX bioassay – transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 240). Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris
- (2) Sonneveld E., Jansen H.J., Riteco J.A., Brouwer A., van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136–148.
- (3) Quaedackers M.E., van den Brink C.E., Wissink S., Schreurs R.H.M.M., Gustafsson J.A., van der Saag P.T. och van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER) α and not through ER β . *Endocrinology* 142(3), 1156–1166.
- (4) Thorne N., Inglese J. och Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology 17(6):646–57.
- (5) Escande A., Pillon A., Servant N., Cravedi J.P., Larrea F., Muhn P., Nicolas J.C., Cavaillès V. och Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459–1469.
- (6) Kuiper G.G., Lemmen J.G., Carlsson B., Corton J.C., Safe S.H., van der Saag P.T., van der Burg B. och Gustafsson J.A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.*, 139, 4252–4263.
- (7) Sotoca A.M., Bovee T.F.H., Brand W., Velikova N., Boeren S., Murk A.J., Vervoort J., Rietjens I.M.C.M. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 122, 204–211.
- (8) Sonneveld E., Riteco J.A.C., Jansen H.J., Pieterse B., Brouwer A., Schoonen W.G., and van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.*, 89(1), 173–187.
- (9) Kobayashi H., Yamamoto K., Eguchi M., Kubo M., Nakagami S., Wakisaka S., Kaizuka M. och Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma

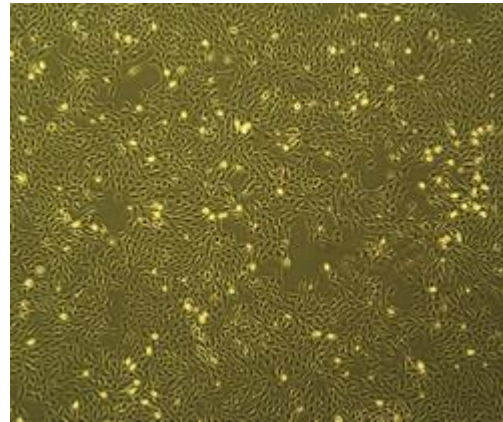
contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769–771.

- (10) Zhang J-H., Chung T.D.Y. och Oldenburg K.R. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Scr.*, 4, 67–73.
- (11) Besselink H., Middelhof .I, och Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ER α CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, Nederländerna.

Tillägg 4.1: Visuell inspektion av cellviabilitet

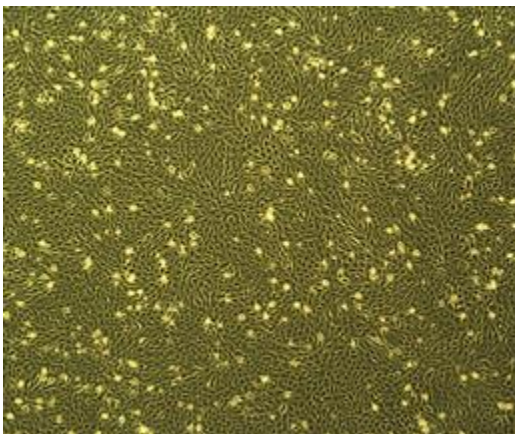


< 5 % konfluens. Cellerna har just såtts. 100 % cellviabilitet.
Klassificering: "ingen cytotoxicitet"



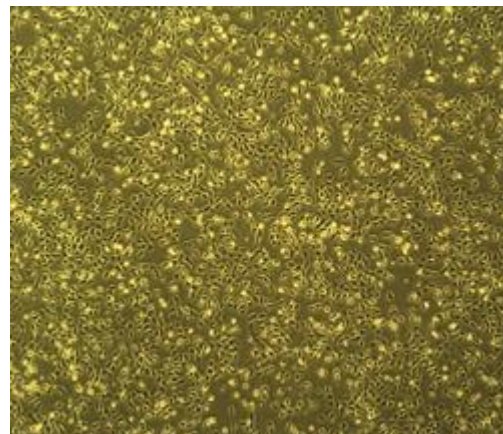
> 85 % konfluens. I detta skede exponeras cellerna för testkemikalier. > 95 % cellviabilitet.

Klassificering: "ingen cytotoxicitet"

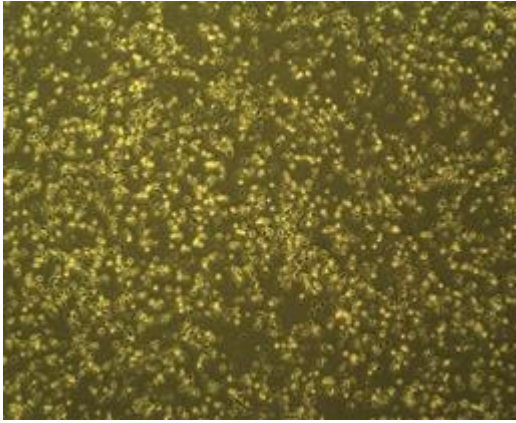


> 95 % konfluens. Cellerna packas tätt och börjar växa över. > 95 % cellviabilitet.

Klassificering: "ingen cytotoxicitet"



< 25 % cellviabilitet. Cellerna släpper och kontakterna mellan dem minskar. Cellerna rundas.
Klassificering: "cytotoxicitet"



< 5 % cellviabilitet. Cellerna har släppt fullständigt och kontakten mellan dem bryts. Cellerna rundas. Klassificering: "cytotoxicitet"

B.67 TEST AV GENMUTATIONER HOS DÄGGDJURSCELLER IN VITRO MED ANVÄNDNING AV TYMIDINKINASGENEN

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 490 (2016). Testmetoderna ses regelbundet över och revideras med avseende på den vetenskapliga utvecklingen, bestämmelser samt djurens välbefinnande. Muslymfomtestet (MLA) och TK6-testet med användning av tymidinkinasloket (TK) ingick ursprungligen i testmetod B.17. Därefter har MLA-expertarbetsgruppen vid International Workshop for Genotoxicity Testing (IWGT) utvecklat internationellt harmoniserade rekommendationer för acceptanskriterier och datatolkning för MLA (1)(2)(3)(4)(5), och dessa rekommendationer inbegrips i denna nya testmetod B.67. Denna testmetod är utformad för MLA, och även för TK6-testet, eftersom den använder TK-lokus. MLA har använts i stor utsträckning för lagstadgade ändamål, medan TK6 har använts betydligt mindre. Det bör noteras att trots likheterna mellan de två cellinjernas endpoints är de inte ömsesidigt utbytbara och de rättsliga systemen kan mycket väl föredra den ena cellinjen framför den andra för ett visst lagstadgat ändamål. Valideringen av MLA visade exempelvis att metoden inte bara är lämplig för att upptäcka genmutation, utan även en testkemikalies förmåga att inducera strukturell kromosomskada. Denna testmetod är en del av en serie av testmetoder för genetisk toxikologi. OECD har utarbetat ett dokument som ger kortfattad information om tester inom genetisk toxikologi och en översikt över de senaste ändringarna av OECD:s testriktlinjer inom detta område (6).
2. Syftet med genmutationstesterna för däggdjursceller in vitro är att upptäcka genmutationer som induceras av kemikalier. De cellinjer som används i dessa tester mäter framåtmutationer i rapportgener, särskilt den endogena tymidinkinasgenen (*TK* för celler från människa och *Tk* för celler från gnagare, i denna testmetod tillsammans kallade *TK*). Denna testmetod är avsedd för användning med två cellinjer: L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C-muslymfomcellinjen (allmänt benämnd L5178Y) och TK6-lymfoblastoidceller från människa (allmänt benämnd TK6). Trots att de två cellinjerna varierar sinsemellan på grund av ursprung, celltillväxt, p53-status osv., kan *TK*-genmutationstester utföras på liknande sätt för båda celltyperna enligt beskrivningen i denna testmetod.
3. Tymidinkinasgenens autosomala och heterozygota karaktär möjliggör detektion av viabla kolonier vars celler saknar enzymet tymidinkinas efter mutation från $TK^{+/-}$ till $TK^{-/-}$. Denna brist kan vara följden av genetiska händelser som påverkar *TK*-genen, och det kan både röra sig om genmutationer (punktmutationer, läsramsmutationer, små deletioner osv.) och kromosomhändelser (stora deletioner, kromosomomlagringar och mitotisk rekombination). De senare händelserna uttrycks som en förlust av heterozygositet, som är en vanlig genetisk förändring hos tumorsuppressorgener i

human tumorigenes. Teoretiskt sett kan en förlust av hela den kromosom som bär *TK*-genen till följd av försämring av kärnsolen och/eller mitotisk icke-disjunktion detekteras i MLA. En kombination av cytogenetisk och molekylär analys visar också tydligt att vissa MLA *TK*-mutanter är följden av icke-disjunktion. Bevisvärdet visar dock att *TK*-genmutationstestet inte på ett tillförlitligt sätt kan detektera aneugener vid tillämpning av standardkriterier för cytotoxicitet (enligt beskrivningen i denna testmetod) , och det är därför inte lämpligt att använda dessa tester för att detektera aneugener (7)(8)(9).

4. I *TK*-genmutationstester genereras två olika fenotypiska klasser av *TK*-mutanter: mutanter med normal tillväxt, som växer i samma takt som *TK*-heterozygota celler, och mutanter med långsam tillväxt, som växer med förlängda fördubblingstider. Mutanter med normal tillväxt och långsam tillväxt känns igen som stora och små kolonimutanter i MLA, och som tidigt och sent uppträdande kolonimutanter i TK6. Den molekylära och cytogenetiska naturen hos både stora och små kolonier av MLA-mutanter har undersökts mycket ingående (8) (10) (11) (12) (13). Den molekylära och cytogenetiska naturen hos tidigt och sent uppträdande TK6-mutanter har också undersökts i stor utsträckning (14) (15) (16) (17). Långsamt växande mutanter för båda celltyperna har lidit genetisk skada som involverar förmodat tillväxtreglerande gener nära *TK*-lokus, vilket leder till förlängda fördubblingstider och bildandet av sent uppträdande eller små kolonier (18). Induktion av mutanter med långsam tillväxt har associerats med kemikalier som inducerar omfattande strukturella förändringar på kromosomnivå. Celler vars skador inte involverar förmodat tillväxtreglerande gener nära *TK*-lokus växer i en liknande takt som de parentala cellerna och blir normalt växande mutanter. Induktion av huvudsakligen normalt växande mutanter associeras med kemikalier som främst agerar som punktmutagener. Följaktligen är det viktigt att räkna både långsamt och normalt växande mutanter för att återvinna alla mutanter och skapa insikt i de typer av skador (mutagener jämfört med klastogener) som induceras av testkemikalien (10) (12) (18) (19).
5. Testmetoden har utformats för att ge allmän information som gäller både MLA och TK6 samt specialiserad vägledning för de individuella testerna.
6. Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

7. Tester som utförs in vitro kräver i allmänhet att en exogen källa för metabolisk aktivering används. Det exogena metaboliska aktiveringssystemet efterliknar inte helt förhållandena in vivo.
8. Åtgärder bör vidtas för att undvika förhållanden som leder till artefaktiska positiva resultat (t.ex. möjlig interaktion med testsystemet) som inte orsakas av interaktion mellan testkemikalierna och cellens genetiska material. Sådana förhållanden kan vara

ändringar av pH eller osmolalitet, interaktion mellan mediets komponenter (20) (21) eller alltför hög cytotoxicitet (22)(23)(24). En cytotoxicitet som överskrider de rekommenderade maxnivåerna för cytotoxicitet enligt definitionen i avsnitt 28 anses vara för hög för MLA och TK6. Dessutom bör det noteras att testkemikalier som är tymidinanaloger eller beter sig som tymidinanaloger kan öka mutantfrekvensen genom selektiv tillväxt hos de spontana bakgrundsmutanterna under cellbehandling, vilket kräver ytterligare testmetoder för lämplig utvärdering (25).

9. Tillverkade nanomaterial kan kräva särskilda anpassningar av testmetoden, men de beskrivs inte här.
10. Innan testmetoden används för att testa en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag.
11. Muterade celler som saknar tymidinkinasenzymaktivitet beroende på mutationen $TK^{+/-}$ to $TK^{-/-}$, är resistent mot de cytostatiska effekterna av pyrimidinanalogen trifluortymidin (TFT). Celler med fungerande tymidinkinas är känsliga för TFT, eftersom TFT orsakar inhibering av cellmetabolismen och stoppar fortsatt celledelning. Muterade celler kan således utvecklas i närvaro av TFT och bilda synliga kolonier, medan celler som innehåller TK-enzymet inte klarar detta.

TESTPRINCIP

12. Celler i suspension exponeras för testkemikalien, både med och utan metabolisk aktivering (se punkt 19), under en lämplig tidsperiod (se punkt 33) och subkultiveras för att bestämma cytotoxiciteten och för att tillåta fenotypisk expression innan mutanturvalet sker. Cytotoxicitet bestäms genom relativ total tillväxt (RTG – se punkt 25) för MLA och genom relativ överlevnad (RS – se punkt 26) för TK6. De behandlade kulturerna förvaras i tillväxtmedium under en tillräckligt lång tid, karakteristisk för varje celltyp (se punkt 37), för att tillåta i det närmaste optimal fenotypisk expression av inducerade mutationer. Mutantfrekvensen bestäms genom att ett känt antal celler sås ut i ett medium som innehåller det selektiva ämnet för detektion av mutantkolonier, och i ett medium utan selektivt ämne för bestämning av kloningseffektiviteten (viabiliteten). Efter en lämplig inkubationstid räknas kolonierna. Mutantfrekvensen beräknas på grundval av antalet mutantkolonier korregerat med kloningseffektiviteten vid tidpunkten för mutanturvalet.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Beredningar

Celler

13. För MLA: Eftersom MLA utvecklades och karakteriserades med användning av sublinjen $TK^{+/-}$ -3.7.2C av L5178Y-celler måste denna specifika sublinje användas för MLA. L5178Y-cellinjen härleddes från ett metylkoltren-inducerat tymiskt lymfom från en DBA-2-mus (26). Clive och medarbetare behandlade L5178Y-celler (av Clive benämnda $TK^{+/+}$ -3) med etylmetansulfonat och isolerade en $TK^{-/-}$ -klon (benämnd $TK^{-/-}$ -3.7) med bromdeoxiuridin som selektivt ämne. Från $TK^{-/-}$ -klonen isolerades och karakteriserades en spontan $TK^{+/-}$ -klon (benämnd $TK^{+/-}$ -3.7.2.) och en subklon (benämnd som $TK^{+/-}$ -3.7.2C) för användning i MLA (27). Karyotypen för cellinjen har publicerats (28)(29)(30)(31). Det modala kromosomantalet är 40. Det finns en metacentrisk kromosom (t12;13) som bör räknas som en kromosom. *TK*-lokus hos möss finns på den distala änden av kromosom 11. Cellinjen L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C har mutationer i båda p53-allelerna och producerar mutant-p53-protein (32) (33). p53-status för cellinjen $TK^{+/-}$ -3.7.2C är sannolikt orsaken till att testet kan detektera storskalig skada (17).
14. För TK6: TK6 är en human lymfoblastoidcellinje. Den parentala cellinjen är cellinjen WI-L2 som transformerats med Epstein-Barr-virus, och som ursprungligen härleddes från en femårig pojke med hereditär sfärocytos. Den första isolerade klonen, HH4, mutageniserades med ICR191 och en *TK*-heterozygot cellinje, TK6, skapades (34). TK6-cellerna är nästan diploida och den representativa karyotypen är 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). *TK*-lokus hos människa finns på den långa armen av kromosom 17. TK6 är en p53-kompetent cellinje, eftersom den har en p53-sekvens av vildtyp i båda allelerna och endast uttrycker p53-protein av vildtyp (36).
15. För både MLA och TK6 gäller att när testlaboratoriet etablerar eller fyller på en stamodling bör det försäkra sig om frånvaro av mykoplasmakontamination, karyotypbestämma cellerna eller färga de kromosomer som hyser *TK*-lokus samt kontrollera populationernas fördubblingstider. Den normala cellcykeltiden för de celler som används i testlaboratoriet bör fastställas och bör överensstämma med kända cellegenskaper (16)(19)(37). Stamodlingen bör lagras vid -150°C eller lägre och användas för att bereda alla arbetslösningar med celler.
16. Antingen innan ett stort antal nedfrysta stammar för användning etableras eller precis innan de används i ett försök, kan odlingen behöva rengöras av redan befintliga muterade celler (om inte lösningsmedelskontrollens mutantfrekvens [MF] redan ligger inom det godtagbara intervallet – se tabell 2 för MLA). Detta åstadkoms genom användning av metotrexat (aminopterin) för att selektera mot celler som saknar *TK* och tillföra tymidin, hypoxantin och glycin (L5178Y) eller 2'-deoxycytidin (TK6) till odlingen för att säkerställa optimal tillväxt hos de *TK*-kompetenta cellerna (19) (38) (39) samt (40) för TK6). Allmänna råd om god praxis för underhåll av cellodlingar och specifika råd för L5178Y- och TK6-celler finns i (19) (31) (37) (39) (41). För laboratorier som behöver stamodlingar för att inleda antingen MLA eller TK6 eller för att erhålla nya stamodlingar finns ett förråd med väl karakteriserade celler tillgängligt (37).

Medier och odlingsbetingelser

17. För båda testen bör lämpliga odlingsmedier och inkubationsförhållanden (odlingskärl, fuktad atmosfär med 5 % CO₂, inkubationstemperatur på 37 °C) väljas för odlingarna. Celler bör alltid odlas under förhållanden som garanterar en logfastillväxt. Det är särskilt viktigt att betingelserna för odlingarna väljs på ett sådant sätt att man säkrar en optimal celltillväxt under expressionsperioden och kloning för både muterade celler och icke-muterade celler. För MLA och TK6 är det också viktigt att odlingsförhållandena säkerställer optimal tillväxt hos både stora kolonier av/tidigt uppträdande TK-mutanter och små kolonier av/sent uppträdande TK-mutanter. Närmare information om odlingsförhållanden, inklusive behovet av att värmeinaktivera hästserum om RPMI-medium används under mutanturvalet, finns i (19) (31) (38) (39) (40) (42).

Beredning av odlingarna

18. Cellerna dras upp från stamodlingar som är sådda i ett odlingsmedium som har en sådan densitet att suspensionsodlingarna fortsätter att växa exponentiellt genom behandlings- och expressionsperioderna.

Metabolisk aktivering

19. Exogena metaboliserande system bör användas när L5178Y- och TK6-cellerna inte har tillräcklig endogen metabolisk kapacitet. Det mest använda systemet, som rekommenderas som standard om inte annat kan motiveras, är en kofaktorstödd postmitokondriell fraktion (S9) som beretts av lever från gnagare (vanligen råttor) som behandlats med enzyminducerande ämnen, t.ex. Aroclor 1254 (43) (44) (45) eller en kombination av fenobarbital och β -naftoflavon (46) (47) (48) (49) (50) (51). Den senare kombinationen bryter inte mot Stockholmskonventionen om långlivade organiska föroreningar (52) och har visat sig vara lika effektiv som Aroclor 1254 när det gäller att inducera multifunktionsoxidaser ("mixed-function oxidases") (45)(46)(47)(48)(49). S9-fraktionen används vanligen i koncentrationer mellan 1–2 volymprocent men kan ökas till 10 volymprocent i det slutliga testmediet. Valet av typ och koncentration av använt exogent metaboliskt aktiveringssystem eller metabolisk induktion kan påverkas av klassen av testkemikalier.

Beredning av testkemikalien

20. Fasta testkemikalier bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och vid behov spädas ut innan cellerna behandlas (se punkt 21). Flytande testkemikalier kan tillsättas direkt till testsystemet och/eller spädas ut före behandling av testsystemet. Gaser eller flyktiga testkemikalier bör testas genom lämpliga modifikationer av standardprotokollen, såsom behandling i slutna odlingskärl (53) (54) (55). Testkemikalien bör beredas strax innan behandling om inte stabilitetsdata visar att lagringen är acceptabel.

TESTBETINGELSER

Lösningsmedel

21. Man bör välja ett lösningsmedel som optimerar testkemikaliens löslighet utan att testet påverkas negativt, t.ex. genom förändringar i celltillväxten, påverkan på testkemikaliens integritet, reaktion med odlingskärlen eller försämrade metabolisk aktivering. När det är möjligt, rekommenderas att man i första hand överväger vattenbaserade lösningsmedel (eller odlingsmedier). Vedertagna lösningsmedel är vatten eller dimetylsulfoxid. Generellt bör organiska lösningsmedel inte överstiga 1 volymprocent och vattenbaserade lösningsmedel (saltlösningar eller vatten) inte överstiga 10 volymprocent i det slutliga behandlingsmediet. Om man använder lösningsmedel som inte är vedertagna (t.ex. etanol eller aceton) bör detta stödjas av data som visar att de är kompatibla med testkemikalierna och testsystemet och att de inte är genotoxiska vid den använda koncentrationen. Om ett sådant underlag saknas är det viktigt att inkludera obehandlade kontroller (se tillägg 1, Definitioner) för att visa att inga skadliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet.

MÄTNING AV CYTOTOXICITET OCH VAL AV BEHANDLINGSKONCENTRATIONER

22. Vid bestämning av maximal testkemikaliekoncentration bör man undvika koncentrationer som kan ge artefaktiska positiva resultat, t.ex. sådana som medför alltför kraftig cytotoxicitet (se punkt 28), fällning i odlingsmediet (se punkt 29) eller betydande ändringar av pH eller osmolalitet (se punkt 8). Om testkemikalien orsakar en betydande ändring av pH i mediet vid tillsättningsstidpunkten kan pH justeras genom buffring av det slutliga behandlingsmedlet för att undvika artefaktiska positiva resultat och upprätthålla lämpliga odlingsförhållanden.
23. Valet av koncentrationer baseras på cytotoxicitet och andra överväganden (se punkterna 27–30). Även om det kan vara användbart att utvärdera cytotoxicitet i ett förberedande test för att bättre definiera de koncentrationer som ska användas i huvudförsöket är ett förberedande test inte obligatoriskt. Även om en inledande cytotoxicitetsbedömning görs måste cytotoxiciteten för varje kultur mätas i huvudförsöket. Om ett förberedande test görs bör det täcka ett stort koncentrationsintervall och kan antingen avslutas på dag 1 efter behandling eller fortsätta genom expressionsperioden på två dagar fram till mutanturvalet (om det står klart att de använda koncentrationerna är lämpliga).
24. Cytotoxicitet bör fastställas för varje individuell test- och kontrollodling: metoderna för MLA (2) och TK6 (15) definieras genom internationellt vedertagen praxis.
25. För både agar- och mikrotiterversionerna av MLA: Cytotoxicitet bör utvärderas med användning av relativ total tillväxt (RTG), som ursprungligen definierades av Clive och Spector 1975 (2). Detta mått omfattar relativ suspensionstillväxt (RSG: testodling

jämfört med lösningsmedelskontroll) under cellbehandling, expressionstiden samt relativ kloningseffektivitet (RCE: testodling jämfört med lösningsmedelskontroll) vid den tidpunkt då mutanterna väljs (2). Det bör noteras att RSG innefattar eventuell cellförlust som förekommer i testodlingen under behandling (formeln anges i tillägg 2).

26. För TK6: Cytotoxicitet bör bedömas genom användning av relativ överlevnad (RS), dvs. kloningseffektiviteten för celler som överförts till platta omedelbart efter behandling, och justeras utifrån eventuell cellförlust under behandlingen samt baseras på antal celler jämfört med den negativa kontrollen (som tilldelas en överlevnadskvot på 100 %) (se tillägg 2 för formeln).
27. Minst tre testkoncentrationer (exklusive lösningsmedel och positiva kontroller) som uppfyller acceptanskriterierna (lämplig cytotoxicitet, antal celler osv.) bör utvärderas. Även om duplikatodling är att föredra kan antingen replikata eller enstaka behandlade odlingar användas för varje koncentration som testas. De resultat som erhålls för replikatodlingarna vid en given koncentration kan slås ihop för dataanalysen (55). För testkemikalier med låg eller ingen cytotoxicitet är det oftast lämpligt att ha intervall med två- till trefaldiga koncentrationer. Om testkemikalien är cytotoxisk bör testkoncentrationerna väljas så att de täcker ett intervall för cytotoxiciteten enligt beskrivningen i punkt 28 och omfatta koncentrationer med måttlig, låg eller ingen cytotoxicitet. Många testkemikalier uppvisar koncentrationsresponskurvor. För att täcka in alla grader av cytotoxicitet eller undersöka koncentrationsresponsen i detalj kan det vara nödvändigt att använda koncentrationer som ligger närmare varandra och fler än fyra koncentrationer, i synnerhet i situationer där försöket måste upprepas (se punkt 70). Användning av mer än fyra koncentrationer kan vara särskilt viktigt vid användning av enstaka odlingar utan replikat.
28. Om den maximala koncentrationen baseras på cytotoxicitet bör den högsta koncentrationen syfta till att uppnå mellan 20 och 10 % relativ total tillväxt (RTG) för MLA, och mellan 20 och 10 % relativ överlevnad (RS) för TK6 (punkt 67).
29. För svårslösliga testkemikalier som inte är cytotoxiska vid koncentrationer som är lägre än den lägsta olösliga koncentrationen bör den högsta analyserade koncentrationen framkalla grumlighet eller en fällning som är synlig med blotta ögat eller med hjälp av ett inverterat mikroskop vid slutet av behandlingen med testkemikalien. Även om cytotoxicitet förekommer över den lägsta olösliga koncentrationen är det lämpligt att testa endast en koncentration som producerar grumlighet eller har en synlig fällning, eftersom fällningen kan ge artefaktiska effekter. MLA och TK6 använder suspensionsodlingar, och det är därför viktigt att noggrant se till att fällningen inte stör testet. Bestämning av löslighet i odlingsmediet före försöket kan också vara användbart.

30. Om ingen fällning eller begränsande cytotoxicitet observeras ska de högsta testkoncentrationerna motsvara det lägsta av följande värden: 10 mM, 2 mg/ml eller 2 µl/ml (57) (58). Om testkemikalien inte har en definierad sammansättning, t.ex. ett ämne med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiskt material (dvs. UVCB-ämnen), miljöextrakt osv., kan man behöva använda en högre toppkoncentration (t.ex. 5 mg/ml) om cytotoxiciteten inte är tillräckligt hög, så att koncentrationen av varje komponent ökas. Det bör dock noteras att dessa krav kan skilja sig för humanläkemedel (59).

Kontroller

31. Parallella negativa kontroller (se punkt 21), bestående av enbart lösningsmedel i behandlingsmediet, och hanterade på samma sätt som behandlingsodlingarna, bör inkluderas för varje testbetingelse.
32. Parallella positiva kontroller behövs för att visa laboratoriets förmåga att identifiera mutagener enligt villkoren i det använda testprotokollet och, i förekommande fall, effektiviteten hos det exogena systemet för metabolisk aktivering, och för att visa adekvat detektion både av små/sent uppträdande och stora/tidigt uppträdande *TK*-mutanter. Exempel på positiva kontroller ges i tabell 1 nedan. Alternativa positiva kontrollämnen kan användas om det är motiverat. In vitro-tester av däggdjursceller med avseende på genetisk toxicitet är tillräckligt standardiserade för kortvariga behandlingar (3–4 timmar) som görs parallellt med och utan metabolisk aktivering med samma behandlingstid. Användningen av positiva kontroller kan därför begränsas till en mutagen som kräver metabolisk aktivering. I detta fall visar en enda positiv kontrollrespons både aktiviteten hos det metaboliska aktiveringssystemet och testsystemets känslighet. Separata positiva kontroller bör dock göras av långvariga behandlingar (dvs. 24 timmar utan S9) om sådana används, eftersom behandlingstiden skiljer sig från testet med metabolisk aktivering. Varje positiv kontroll bör användas för en eller flera koncentrationer som förväntas ge ökningar över bakgrunden som går att reproducera och detektera. Syftet med detta är att visa testsystemets sensitivitet, och responsen får inte äventyras av cytotoxicitet som överskrider de gränser som anges i denna testmetod (se punkt 28).

Tabell 1: Rekommenderade referensämnen för utvärdering av laboratoriets kompetens och för val av positiva kontroller.

Kategori	Ämne	CAS-nr
1. Mutagener utan metabolisk aktivering		
Metylmetansulfonat	66-27-3	
Mitomycin C	50-07-7	
4-nitrokinolin-N-oxid	56-57-5	
2. Mutagener som kräver metabolisk aktivering		

Benso(a)pyren	50-32-8
Cyklofosfamid (monohydrat)	50-18-0 (6055-19-2)
7,12-dimetylbenzantracen	57-97-6
3-metylkolantren	56-49-5

FÖRFARANDE

Behandling med testkemikalien

33. Prolifererande celler behandlas med testkemikalien i såväl närvaro som frånvaro av ett system för metabolisk aktivering. Exponering bör ske under en lämplig tidsperiod (normalt är 3 till 4 timmar tillräckligt). Det bör dock noteras att dessa krav kan skilja sig för humanläkemedel (59). I fall där den kortsiktiga behandlingen ger negativa resultat för MLA och det finns information som tyder på att det krävs en längre behandling [t.ex. nukleosida analoger, svårlösliga kemikalier (5)(59)], bör man överväga att utföra testet med längre behandling, dvs. 24 timmar utan S9.
34. Minimiantalet celler som används i varje testodling (kontrollodlingar och behandlade odlingar) för varje etapp i testet bör baseras på den spontana mutantfrekvensen. En generell regel är att behandla och ympa om ett tillräckligt antal celler i varje försöksodling för att bibehålla minst 10 men helst 100 spontana mutanter i alla faser av testet (behandling, fenotypiskt uttryck och mutanturval) (56).
35. För MLA är den rekommenderade godtagbara spontana mutantfrekvensen $35\text{--}140 \times 10^{-6}$ (agarversionen) och $50\text{--}170 \times 10^{-6}$ (mikrotiterversionen) (se tabell 2). För att minst 10 och helst 100 spontana mutanter ska överleva behandlingen för varje testodling är det nödvändigt att behandla minst 6×10^6 celler. Om detta antal celler behandlas och ett tillräckligt antal celler bibehålls under expressionsperioden och kloningen för mutanturvalet, ger det ett tillräckligt antal spontana mutanter (tio eller fler) under alla faser i försöket, även för de odlingar som behandlas vid koncentrationer som leder till 90 % cytotoxicitet (mätt med en RTG på 10 %) (19)(38)(39).
36. För TK6 brukar den spontana mutantfrekvensen ligga på mellan 2 och 10×10^{-6} . För att minst 10 spontana mutanter ska överleva behandlingen för varje odling är det nödvändigt att behandla minst 20×10^6 celler. Om detta antal celler behandlas erhålls ett tillräckligt antal spontana mutanter (tio eller fler), även för de odlingar som behandlas vid koncentrationer som leder till 90 % cytotoxicitet under behandling (10 % RS). Dessutom måste ett tillräckligt stort antal celler odlas fram under expressionsperioden och överföras till platta för mutanturvalet (60).

Fenotypisk expressionstid och mätning av cytotoxicitet och mutantfrekvens

37. I slutet av behandlingsperioden odlas celler under en fastställd tidsperiod så att nära optimal fenotypisk expression av nyligen inducerade mutanter medges, som är specifik för varje cellinje. För MLA är den fenotypiska expressionstiden två dagar. För TK6 är den fenotypiska expressionstiden tre till fyra dagar. Om 24-timmarsbehandling används inleds expressionstiden när behandlingen har avslutats.
38. Under den fenotypiska expressionsperioden räknas cellerna dagligen. För MLA används den dagliga cellräkningen för att beräkna den dagliga suspensionstillväxten (SG). Efter den två dagar långa expressionsperioden suspenderas cellerna i ett medium med eller utan selektivt ämne för bestämning av antalet mutanter (urvalsplattor) respektive kloningseffektivitet (viabilitetsplattor). För MLA finns det två lika godtagbara metoder för kloning av mutanturvalet: i den ena metoden används mjuk agar och i den andra ett flytande medium i 96-hålsplattor (19) (38) (39). Kloningen i TK6 utförs med ett flytande medium och 96-hålsplattor (16).
39. Trifluortymidin (TFT) är det enda rekommenderade selektiva ämnet för *TK*-mutanter (61).
40. För MLA räknas agarplattor och mikrotiterplattor efter 10–12 dagars inkubation. Vad beträffar TK6 räknas kolonierna i mikrotiterplattorna efter 10–14 för de tidigt uppträdande mutanterna. För att återvinna långsamt växande (sent uppträdande) TK6-mutanter är det nödvändigt att återigen tillföra cellerna tillväxtmedium och TFT efter räkningen av tidigt uppträdande mutanter och därefter inkubera plattorna i ytterligare 7–10 dagar (62). Räkningen av långsamt och normalt växande *TK*-mutanter diskuteras i punkterna 42 och 44.
41. Lämpliga beräkningar för de två testerna inklusive de två metoderna (agar och mikrotiterplatta) för MLA anges i tillägg 2. När det gäller agarmetoden för MLA räknas kolonierna och antalet mutantkolonier justeras med kloningseffektiviteten för att beräkna en mutantfrekvens. Vad gäller mikrotiterversionen för MLA och TK6 bestäms kloningseffektiviteten för både urvals- och kloningseffektivitetsplattorna enligt Poissonfördelningen (63). Mutantfrekvensen beräknas utifrån dessa två kloningseffektivitetsvärden.

Karaktisering av mutantkolonier

42. För MLA bör, om testkemikalien är positiv (se punkterna 62–63), karaktiseringen av kolonier genom kolonistorlek eller tillväxt utföras på minst en av testodlingarna (vanligen den högsta godtagbara positiva koncentrationen) och på de negativa och positiva kontrollerna. Om testkemikalien är negativ (se punkt 64) bör karaktiseringen av mutantkolonier utföras på de negativa och positiva kontrollerna. I mikrotitermetoden för MLA definieras små kolonimutanter som sådana som täcker mindre än 25 % av hålets diameter, och stora kolonimutanter som sådana som täcker mer än 25 % av hålets diameter. För agarmetoden används en automatisk koloniräknare för att räkna mutantkolonierna och bestämma kolonistorlek. Metoder

för storleksbestämning av kolonier anges i litteraturen (19) (38) (40). Karakterisering av kolonier för den negativa och positiva kontrollen är nödvändig för att visa att studierna utförs på lämpligt sätt.

43. Testkemikalien kan inte bestämmas som negativ om varken de stora eller de små kolonimutanterna detekteras korrekt i den positiva kontrollen. Kolonikarakterisering kan användas för att tillhandahålla allmän information om testkemikaliens förmåga att orsaka punktmutationer och/eller kromosomhändelser (punkt 4).
44. TK6: Normalt växande och långsamt växande mutanter differentieras genom en skillnad i inkubationstid (se punkt 40). För TK6 räknas vanligen både de tidigt och de sent uppträdande mutanterna för samtliga odlingar, inklusive de negativa och positiva kontrollerna. Karakterisering av kolonier för den negativa och positiva kontrollen är nödvändig för att visa att studierna utförs på lämpligt sätt. Testkemikalien kan inte bestämmas som negativ om varken de tidigt eller de sent uppträdande mutanterna detekteras korrekt i den positiva kontrollen. Kolonikarakterisering kan användas för att tillhandahålla allmän information om testkemikaliens förmåga att orsaka punktmutationer och/eller kromosomhändelser (punkt 4).

Laboratoriets kompetens

45. För att visa att det finns tillräcklig erfarenhet av testet innan det används för rutintestning bör laboratoriet ha utfört en serie försök med positiva referenskemikalier som agerar via olika mekanismer (minst ett som är aktivt med och ett som är aktivt utan metabolisk aktivering, valt från kemikalierna i tabell 1) och flera negativa kontroller (inklusive obehandlade odlingar och olika lösningsmedel/vehiklar). Dessa positiva och negativa kontrollresponser bör överensstämma med litteraturen. Detta gäller inte laboratorier som redan har erfarenhet, dvs. har en sådan historisk databas som beskrivs i punkterna 47–50. För MLA bör de värden som erhålls för både positiva och negativa kontroller överensstämma med IWGT-rekommendationerna (se tabell 2).
46. Ett urval av positiva kontrollämnen (se tabell 1) bör undersökas med korta och långa behandlingstider (om långa behandlingstider används) utan metabolisk aktivering, och även med kort behandlingstid med metabolisk aktivering, för att visa att det har kompetens att upptäcka mutagena kemikalier, bestämma effektiviteten hos det metaboliska aktiveringssystemet och visa att det råder lämpliga förhållanden för celltillväxt under behandling, fenotypisk expression och mutanturval samt att räkningsförfarandena är lämpliga. En rad koncentrationer av de valda ämnena bör användas för att ge reproducerbara och koncentrationsrelaterade ökningskurvor över bakgrunden i syfte att visa testsystemets sensitivitet och dynamiska omfång.

Historiska kontrolldata

47. Laboratoriet bör fastställa följande:

- Historiskt positivt kontrollintervall samt fördelning.
 - Historiskt negativt (obehandlad, lösningsmedel) kontrollintervall samt fördelning.
48. Om data för en historisk negativ kontrollfördelning samlas in först bör de parallella negativa kontrollerna överensstämja med publicerade data för negativa kontroller. Allteftersom kontrollfördelningen kompletteras med fler försöksdata bör de parallella negativa kontrollerna företrädesvis ligga inom fördelningens kontrollgräns på 95 % (64) (65).
49. Laboratoriets historiska negativa kontrolldatabas bör inledningsvis baseras på minst 10 försök, men bör helst bestå av minst 20 försök utförda under jämförbara testbetingelser. Laboratorierna bör använda kvalitetskontrollmetoder såsom kontrolldiagram (t.ex. C-diagram eller X-stapelldiagram (65)), för att fastställa hur variabla deras positiva och negativa kontrolldata är och för att visa att metoden är ”under kontroll” i deras laboratorium (66). Närmare anvisningar och rekommendationer om hur man bygger upp och använder de historiska data finns i litteraturen (64).
50. Negativ kontrolldata bör bestå av mutantfrekvenser från enstaka eller helst replikata odlingar enligt beskrivningen i punkt 27. Parallella negativa kontroller bör helst ligga inom kontrollgränsen på 95 % för fördelningen av laboratoriets historiska negativa kontrolldatabas. Om negativa kontrolldata faller utanför kontrollgränsen på 95 % kan de ändå ingå i den historiska kontrollfördelningen så länge de inte är extremt avvikande och det finns bevis för att testsystemet är under kontroll (se punkt 49) och att inga tekniska eller mänskliga fel förekommit.
51. Eventuella ändringar av försöksprotokollen bör övervägas när det gäller datas överensstämmelse med laboratoriets befintliga historiska kontrolldatabaser. Alla större inkonsekvenser bör leda till att en ny historisk kontrolldatabas upprättas.

DATA OCH RAPPORTERING

Presentation av resultaten

52. Presentationen av data för både MLA och TK6 bör, för både behandlade odlingar och kontrollodlingar, innefatta de data som krävs för beräkning av cytotoxicitet (relativ total tillväxt respektive relativ överlevnad) och mutantfrekvenser, enligt beskrivningen nedan.
53. För MLA bör data för enskilda odlingar lämnas för relativ suspensionstillväxt, relativ total tillväxt, kloningseffektivitet vid tidpunkten för mutanturvalet samt antal mutantkolonier (för agarversionen) eller antal tomma hål (för mikrotiterversionen). Mutantfrekvensen bör uttryckas som antalet muterade celler per miljon överlevande celler. Om responsen är positiv bör mutantfrekvensen för små och stora kolonier (och/eller procentandelen av den totala mutantfrekvensen) anges för minst en

koncentration av testkemikalien (vanligen den högsta positiva koncentrationen) samt de negativa och positiva kontrollerna. I händelse av negativ respons bör mutantfrekvensen för små och stora kolonier anges för den negativa och den positiva kontrollen.

54. För TK6 bör data för enskilda odlingar anges för relativ överlevnad, kloningseffektivitet vid tidpunkten för mutanturvalet samt antalet tomma hål för tidigt och sent uppträdande mutanter. Mutantfrekvensen bör uttryckas som antalet muterade celler per antalet överlevande celler, och bör inbegripa den totala mutantfrekvensen och mutantfrekvensen (och eller procentandelen av den totala mutantfrekvensen) för tidigt och sent uppträdande mutanter.

Acceptanskriterier

55. Följande kriterier bör uppfyllas för både MLA och TK6 innan de övergripande resultaten bestäms för en specifik testkemikalie:
- Två olika testbetingelser (dvs kort behandlingstid med och utan metabolisk aktivering – se punkt 33) har tillämpats om inte ett av dem gav positiva resultat.
 - Tillräckligt många celler och koncentrationer bör finnas tillgängliga för analys (se punkterna 27 och 34–36).
 - Urvalskriterierna för toppkoncentrationen överensstämmer med de kriterier som beskrivs i punkterna 28–30.

Acceptanskriterier för negativa och positiva kontroller

56. IWGT:s expertarbetsgrupp för MLA genomförde en analys av en stor mängd MLA-data, som ledde till internationell enighet om specifika acceptanskriterier för MLA (1)(2)(3)(4)(5). Denna testmetod innehåller därför särskilda rekommendationer för att fastställa om negativa och positiva kontroller kan godtas och för utvärdering av enskilda ämnesresultat i MLA. TK6 har en mycket mindre databas och har inte utvärderats av en arbetsgrupp.
57. För MLA bör varje försök utvärderas för att se om den obehandlade kontrollen/lösningssmedelskontrollen uppfyller IWGT MLA-arbetsgruppens acceptanskriterier ((4) och tabell 2 nedan) för 1) mutantfrekvens (observera att de mutantfrekvenser som IWGT anser vara godtagbara skiljer sig åt för agar- och mikrotiterversionerna av MLA), 2) kloningseffektivitet vid tidpunkten för mutanturvalet, och 3) suspensionstillväxt för lösningssmedelskontrollen (formeln anges i tillägg 2).

Tabell 2: Acceptanskriterier för MLA

Parameter	Mjukagarmetod	Mikrotitermetod
Mutantfrekvens	35–140 x 10 ⁻⁶	50–170 x 10 ⁻⁶

Kloningseffektivitet	65–120 %	65–120 %
Suspensionstillväxt	8–32-faldig (3–4 timmars behandling) 32–180-faldig (24 timmars behandling, om den utförs)	8–32-faldig (3–4 timmars behandling) 32–180-faldig (24 timmars behandling, om den utförs)

58. För MLA bör varje test även utvärderas för att se om de positiva kontrollerna uppfyller minst en av följande två acceptanskriterier som har tagits fram av IWGT-arbetsgruppen:

- Den positiva kontrollen bör uppvisa en absolut ökning i total mutantfrekvens, dvs. en ökning över den spontana bakgrundsmutantfrekvensen (inducerad mutantfrekvens [IMF]) på minst 300×10^{-6} . Minst 40 % av IMF bör avspeglas i mutantfrekvensen för små kolonier.
- Den positiva kontrollen ska uppvisa en ökning av mutantfrekvensen i små kolonier på minst 150×10^{-6} över den frekvens som observeras i den parallella obehandlade/lösningssmedelskontrollen (en IMF i små kolonier på 150×10^{-6}).

59. För TK6 är ett test godtagbart om den parallella negativa kontrollen anses godtagbar för registrering i laboratoriets historiska databas över negativa kontroller enligt punkterna 48–49. Parallella positiva kontroller (se punkt 32) bör dessutom framkalla reaktioner som överensstämmer med de kontroller som genereras i den historiska databasen över positiva kontroller och ge en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.

60. För båda testerna bör den övre cytotoxicitetsgräns som observerats i den positiva kontrollodlingen vara densamma som för försökskulturerna, dvs. relativ total tillväxt/relativ överlevnad (RTG/RS) bör inte vara lägre än 10 %. Det är tillräckligt att använda en enstaka koncentration (eller en av koncentrationerna i de positiva kontrollodlingarna om fler än en koncentration används) för att visa att acceptanskriterierna för den positiva kontrollen har uppfyllts. Den positiva kontrollens mutantfrekvens måste dessutom ligga inom det godtagbara intervall som har fastställts av laboratoriet.

Utvärdering och tolkning av resultaten

61. För MLA har ingående arbete om biologisk relevans och kriterier för positiv respons utförts av IWGT:s expertarbetsgrupp för muslymfom (4). Denna testmetod innehåller därför särskilda rekommendationer för tolkning av testkemikalieresultat från MLA (se punkterna 62–64). TK6 har en mycket mindre databas och har inte utvärderats av en arbetsgrupp. Rekommendationerna för tolkning av data för TK6 är därför mer generellt utformade (se punkterna 65–66). Ytterligare rekommendationer gäller för båda testerna (se punkterna 67–71).

MLA

62. En metod för att definiera positiva och negativa responser rekommenderas för att säkerställa att den ökade mutantfrekvensen är biologiskt relevant. I stället för de statistiska analyser som generellt används för andra tester bygger denna metod på användningen av en på förhand fastställd inducerad mutantfrekvens (dvs. en ökning av mutantfrekvensen utöver den parallella kontrollen). Den bestämmer den globala utvärderingsfaktorn (GEF), som i sin tur baseras på en analys av distributionen av data om mutantfrekvensen i negativa kontroller från deltagande laboratorier (4). För agarversionen av MLA är $GEF = 90 \times 10^{-6}$, och för mikrotiterversionen är $GEF = 126 \times 10^{-6}$.
63. Förutsatt att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses en testkemikalie vara klart positiv om ökningen av mutantfrekvensen över den parallella bakgrunden överskrider GEF under något av de undersökta testbetingelserna (se punkt 33), och ökningen är koncentrationsrelaterad (t.ex. med användning av ett trendtest). Testkemikalien anses då kunna inducera mutation i detta testsystem.
64. Förutsatt att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses en testkemikalie vara klart negativ om det inte förekommer någon koncentrationsrelaterad respons under något av de undersökta testbetingelserna (se punkt 33), eller om det finns en ökning av mutantfrekvensen som inte överskrider GEF. Testkemikalien anses då inte kunna inducera mutationer i detta testsystem.

TK6

65. Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart positiv om något av följande gäller för någon av de undersökta testbetingelserna (se punkt 33):
- Minst en av testkoncentrationerna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.
 - Det finns ingen koncentrationsrelaterad ökning vid utvärdering med ett lämpligt trendtest (se punkt 33).
 - Något av resultaten ligger utanför fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser, se punkt 48).

Om alla dessa kriterier är uppfyllda anses testkemikalien kunna inducera mutation i detta testsystem. Rekommendationer om de lämpligaste statistiska metoderna finns i litteraturen (66) (67).

66. Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart negativ om följande gäller för samtliga undersökta testbetingelser (se punkt 33):

- Ingen av testkoncentrationerna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.
- Det finns ingen koncentrationsrelaterad ökning vid utvärdering med ett lämpligt trendtest.
- Alla resultat ligger inom fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser, se punkt 48).

Testkemikalien anses inte kunna inducera avvikelser i detta testsystem.

För både MLA och TK6:

67. Om den maximala koncentrationen baseras på cytotoxicitet bör den högsta koncentrationen syfta till att uppnå mellan 20 och 10 % RTG/RS. Det råder samförstånd om att man bör vara försiktig vid tolkning av positiva resultat som endast påvisats mellan 20 och 10 % RTG/RS. Resultatet anses inte vara positivt om ökningen av mutantfrekvensen endast inträffade vid eller under 10 % RTG/RS (om dessa värden utvärderas) (2)(59).
68. Under vissa omständigheter kan kompletterande information bidra till att fastställa att en testkemikalie inte är mutagen när det inte finns någon odling som visar ett RTG-värde mellan 10–20 % RTG/RS. Dessa situationer kan beskrivas enligt följande: 1) Det finns inga bevis på mutagenicitet (t.ex. ingen dosrespons, inga mutantfrekvenser över de frekvenser som observerats i den parallella negativa kontrollen eller i historiska bakgrundsintervall osv.) i en serie av datapunkter inom 100 % till 20 % RTG/RS och det finns minst en datapunkt mellan 20 och 25 % RTG/RS. 2) Det finns inga bevis på mutagenicitet (t.ex. ingen dosrespons, inga mutantfrekvenser över de frekvenser som observerats i den parallella negativa kontrollen eller i historiska bakgrundsintervall osv.) i en serie av datapunkter mellan 100 % till 25 % RTG/RS och det finns även en negativ datapunkt strax under 10 % RTG/RS. I båda dessa situationer kan testkemikalien anses vara negativ.
69. Det finns inget krav på verifiering av ett tydligt positivt eller negativt svar.
70. Om responsen varken är klart negativ eller klart positiv enligt beskrivningen ovan och/eller för att bidra till att fastställa resultatets biologiska relevans bör data utvärderas genom en expertbedömning och/eller ytterligare undersökningar. Det kan även vara användbart att upprepa försöket under ändrade testförhållanden [t.ex. koncentrationsavstånd för att öka sannolikheten för att uppnå datapunkter inom intervallet 10–20 % RTG/RS, med användning av andra metaboliska aktiveringsvillkor (dvs. S9-koncentration eller S9-ursprung och behandlingstid)].
71. I sällsynta fall är det, trots ytterligare undersökningar, inte möjligt att dra en slutsats om huruvida testkemikalien ger positiva eller negativa resultat. Responsen av testkemikalien ska i sådana fall anses vara tvetydig (vilket ska tolkas som att den lika gärna kan vara positiv som negativ).

TESTRAPPORT

72. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

- källa, satsnummer, sista förbrukningsdag om detta anges,
- testkemikalies stabilitet i sig, om den är känd,
- löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet, om detta är känt,
- mätning av pH, osmolalitet och fällningar i det odlingsmedium till vilket testkemikalien tillsattes, i förekommande fall.

Monokomponentämne:

- fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,
- kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.

Multikomponentämne, UVCB-ämnen och blandningar:

- karakteriseras så långt som möjligt genom kemisk beteckning (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.

Lösningsmedel:

- motivering av valet av lösningsmedel,
- procentandelen lösningsmedel i den slutliga odlingsmediet.

Celler:

För masterkulturer i laboratorium:

- cellernas typ och källa samt historia i det testande laboratoriet,
- kromosomernas karyotypiska kännetecken och/eller modala antal,
- metoder för underhåll av cellodlingar,
- frånvaro av mykoplasma,
- fördubblingstid.

Testbetingelser:

- grund för val av koncentrationer och antalet cellodlingar, inklusive t.ex. cytotoxicitetsdata och löslighetsbegränsningar,

- mediets sammansättning, CO₂-koncentration, luftfuktighet,
- testkemikaliens koncentration, uttryckt som slutlig koncentration i odlingsmediet (t.ex. µg eller mg/ml eller mM av odlingsmediet),
- koncentration (och/eller volym) av det lösningsmedel och den testkemikalie som tillförs odlingsmediet,
- inkubationstemperatur,
- inkubationstid,
- behandlingens varaktighet,
- celldensitet under behandlingen,
- typ och sammansättning hos det system som används för metabolisk aktivering (S9-källa, beredningsmetod för S9-blandningen, koncentration eller volym för S9-blandningen, S9 i det slutliga odlingsmediet, kvalitetskontroller av S9),
- positiva och negativa kontrollämnen, slutkoncentrationer för varje behandlingsförhållande,
- expressionsperiodens längd (inklusive antal celler som inokulerats, samt subkulturer och scheman för näringstillförsel, om detta är tillämpligt),
- det selektiva ämnets identitet och koncentration,
- för MLA bör använd version (agar eller mikrotiterplatta) anges,
- acceptanskriterier för testerna,
- metoder som används för att räkna antalet viabla och muterade celler,
- metoder som används för mätning av cytotoxicitet,
- all tilläggsinformation som är relevant rörande cytotoxicitet samt använd metod,
- inkubationstidens varaktighet efter överföring till platta,
- definition av kolonier vars storlek och typ ska beaktas (inklusive kriterier för ”små” och ”stora” kolonier, där detta är tillämpligt),
- kriterier för att bedöma om testresultaten är positiva, negativa eller tvetydiga,
- metoder som används för att bestämma pH, osmolalitet, om detta görs och utfällningar, om relevant.

Resultat:

- antal behandlade celler och antal subkultiverade celler i varje odling,
- toxicitetsparametrar (RTG för MLA och RS för TK6),
- tecken på utfällning och tid för bestämningen,

- antal celler som överförts till platta i selektiva och icke-selektiva medier,
- antal kolonier i icke-selektiva medier och antal resistent kolonier i selektiva medier, samt relaterad mutantfrekvens,
- kolonistorlek för de negativa och positiva kontrollerna, och om testkemikalien är positiv, minst en koncentration och relaterade mutantfrekvenser,
- koncentration-responsförhållande, där det är möjligt,
- data om parallella negativa (lösningsmedel) och positiva kontroller (koncentrationer och lösningsmedel),
- historiska negativa (lösningsmedel) och positiva kontrolldata (koncentrationer och lösningsmedel), med variationer, medelvärden och standardavvikelser, antal tester som de historiska testerna baseras på,
- statistik (för individuella odlingar och sammanslagna replikat, i förekommande fall) samt p-värden om dessa finns, och för MLA, GEF-utvärderingen.

Diskussion av resultaten

Slutsats

LITTERATUR

- (1) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35 (3): s. 185–190.
- (2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (april 2000), *Environ. Mol. Mutagen.*, 40 (4): s. 292–299.
- (3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, *Mutation Res.*, 540: s. 127–140.
- (4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (1): s. 1–5.
- (5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005,

Recommendations for 24-h Treatment, *Mutation. Res.*, 627 (1): s. 36–40.

- (6) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, nr 234, OECD, Paris.
- (7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. och O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. *Mutation. Res.*, 746 (1): s. 21–28.
- (8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. och Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. *Mutation Res.*, 493, 1–2: s. 101–114.
- (9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. och Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol. Sci.*, 109 (1): s. 96–105.
- (10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. och Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Proc. National. Academy. Sci. USA*, 87 (1): s. 51–55.
- (11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. och Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/TK^{+/-} Leads to TK^{-/-} Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, *Mutation Res.*, 84 (1): s. 169–181.
- (12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. och Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y TK^{-/-} Mutants Early in their Clonal History, *Mutation Res.*, 147 (5): s. 237–242.
- (13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. och Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151 (1): s. 161–174.
- (14) Liber H.L., Call K.M. och Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation Res.*, 178 (1): s. 143–153.

- (15) Li C.Y., Yandell D.W. och Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 18 (1): s. 77–87.
- (16) Honma M., Hayashi M. och Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation. Res.*, 374 (1): s. 89–98.
- (17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. och Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. *Mol. Carcinogen.*, 28 (4): s. 203–214.
- (18) Amundson S.A. och Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. *Mutation Res.*, 267 (1): s. 89–95.
- (19) Schisler M.R., Moore M.M. och Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y TK^{+/−}-3.7.2C) Forward Mutation Assay. In *Protocols in Genotoxicity Assessment* A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: s. 27–50.
- (20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. och Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, *Mutation Res.*, 634 (1–2): s. 177–183.
- (21) Nessler, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. och Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutagen.*, 49 (6): s. 439–452.
- (22) Brusick D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environ. Mutagen.*, 8 (6): s. 879–886.
- (23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. och Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268 (2): s. 297–305.
- (24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. och Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257: s. 147–204.
- (25) Wang J., Heflich R.H. och Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase

Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. *Mutation Res.*, 626 (1–2): s. 185–190.

- (26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. *Ann. N.Y. Academy Sci.*, 76: s. 673–680.
- (27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. och Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK[±] - Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutation Res.*, 59(1): s. 61–108.
- (28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. och Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK[±] 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 147 (5): s. 243–253.
- (29) Sawyer J.R., Moore M.M. och Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK[±] Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 214 (2): s. 181–193.
- (30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. och Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y TK[±]-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (2): s. 127–131.
- (31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. och Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y TK[±] Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, *Environ. Mol. Mutagen.*, 55 (1): s. 35–42.
- (32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. och DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y TK[±] Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. *Mutation. Res.*, 373 (2): s. 157–165.
- (33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. och Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. *Mutagen.*, 19 (4): s. 263–268.
- (34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. och Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 84 (2): s. 411–416.

- (35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45 (2–3): s. 162–176.
- (36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. och Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. *Cancer. Res.*, 55 (1): s. 12–15.
- (37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manus under bearbetning.)
- (38) Lloyd M. och Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. *Springer Protocols: Methods in Molecular Biology* 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35–54.
- (39) Mei N., Guo X. och Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. I: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z. och Caldwell (Eds) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.
- (40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. *Mutation Res.*, 94 (2): s. 467–485.
- (41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. och Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. *ATLA*, 33 (3): s. 261–287.
- (42) Moore M.M. och Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, *Mutation Res.*, 104 (4–5): s. 287–294.
- (43) Ames B.N., McCann J. och Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31 (6): s. 347–364.
- (44) Maron D.M. och Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113 (3–4): s. 173–215.

- (45) Natarajan, A.T., Tate, A.D., Van Buul, P.P.W., Meijers, M. och De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37 (1): s. 83–90.
- (46) Matsuoka A., Hayashi M. och Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. *Mutation Res.*, 66 (3): s. 277–290.
- (47) Ong T.M., et al. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4 (1): s. 55–65
- (48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. och Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagen.*, 7 (3): s. 175–177.
- (49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. och Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. I: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., et al. (Eds, Elsevier, North-Holland, s. 85–88.
- (50) Galloway S.M., et al.(1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312 (3): s. 241–261.
- (51) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. och Galloway, S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28 (1): s. 51–59.
- (52) Unep (2001). Stockholmskonventionen om långlivade organiska föroreningar, FN:s miljöprogram (Unep).
- (53) Krahn, D.F., Barsky, F.C. och McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. I: *Genotoxic Effects of Airborne Agents* Tice R.R., Costa D.L. och Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, s. 91–103.
- (54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. och Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen

Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environ. Mutagen.*, 5 (6): s. 795–801.

- (55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. och Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. *Mutation Res.*, 652 (2): s. 122–130.
- (56) Arlett C.F., et al. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. I: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), Cambridge University Press, s. 66–101.
- (57) Morita T., Honma M. och Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. *Mutation Res.*, 741 (1-2): s. 32–56.
- (58) Brookmire L., Chen J.J. och Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 54 (1): s. 36–43.
- (59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Se [<https://www.federalregister.gov/a/2012-13774>].
- (60) Honma M. och Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 52 (5): s. 373–384.
- (61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. och Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient (TK^{-/-}) Mutants from L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.*, 85 (5): s. 363–378.
- (62) Liber H.L., Yandell D.W. och Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. *Mutation Res.*, 216 (1): s. 9–17.
- (63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. och Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. *Anal. Biochem.*, 110 (1): s. 1–8.

- (64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. och Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, *Mutation Res.*, 723 (2): s. 87–90.
- (65) Ryan T.P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.
- (66) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. *Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 199)*, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.
- (67) Fleiss J.L., Levin B. och Paik M.C. (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Tillägg 1

DEFINITIONER

Aneugen: en kemikalie eller en process som genom växelverkan med komponenterna i den mitotiska och meiotiska celldelningscykeln leder till aneuploidi i celler eller organismer.

Aneuploidi: alla avvikelser från det normala antalet diploida (eller haploida) kromosomer med en eller flera kromosomer, men inte med hela uppsättningar kromosomer (polyploidi).

Mutagener som orsakar basparsubstitutioner: kemikalier som orsakar basparsubstitution i DNA.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Kloningseffektivitet: procentandel celler som överförs till platta vid låg densitet, som kan växa till en koloni och räknas.

Klastogen: alla kemikalier eller processer som orsakar strukturella kromosomavvikelser i populationer av celler eller organismer.

Cytotoxicitet: för de analyser som omfattas av denna testmetod definieras cytotoxicitet som en reduktion i den relativa totala tillväxten (RTG) eller den relativa överlevnaden (RS) för MLA respektive TK6.

Framåtmutation: en genmutation från den parentala typen till mutantformen, vilket ger upphov till en förändring eller förlust av den enzymatiska aktiviteten eller funktionen hos det protein som bildas.

Läsramsmutagener: kemikalier som orsakar addition eller deletion av ett eller flera baspar i DNA-molekylen.

Genotoxisk: en allmän term som omfattar alla typer av DNA- och kromosomskador, inklusive brott, addukter, omlagringar, mutationer, kromosomavvikelser och aneuploidi. Inte alla typer av genotoxiska effekter leder till mutationer eller stabila kromosomskador.

Mitotisk rekombination: rekombination mellan homologa kromatider under mitosen, vilket kan resultera i dubbla trådbrott i DNA eller förlust av heterozygositet.

Mutagent ämne: ämne som producerar en ärftlig ändring av DNA-basparssekvensen (-sekvenserna) i gener eller i kromosomstrukturen (kromosomavvikelser).

Mutantfrekvens: antalet muterade celler som observerats, delat med antalet viabla celler.

Fenotypisk expressionstid: den tid efter behandlingen under vilken den genetiska förändringen fixeras i genomet och de ursprungliga genprodukterna försvinner i så hög grad att den fenotypiska egenskapen förändras.

Relativ överlevnad (RS): RS används som ett mått på behandlingsrelaterad cytotoxicitet i TK6. RS är den relativa kloningseffektiviteten (CE) för celler som överförs till platta omedelbart efter cellbehandling justerat utifrån eventuell cellförlust under behandlingen och jämfört med kloningseffektiviteten i den negativa kontrollen.

Relativ suspensionstillväxt (RSG): för MLA, den relativa totala tvådagars suspensionstillväxten av testodlingen jämförd med den totala tvådagars suspensionstillväxten för den negativa kontrollen/lösningssmedelskontrollen (Clive och Spector, 1975). RSG bör innefatta testodlingens relativa tillväxt jämförd med den negativa kontrollen/lösningssmedelskontrollen under behandlingsperioden.

Relativ total tillväxt (RTG): RTG används som ett mått på behandlingsrelaterad cytotoxicitet i MLA. RTG är ett mått på testodlingarnas relativa tillväxt (jämfört med vehikelkontrollen) under behandlingen, expressionsperioden på två dagar och mutanturvalets kloningsfaser i testet. Testodlingens relativa suspensionstillväxt multipliceras med testodlingens relativa kloningseffektivitet vid tidpunkten för mutanturvalet, och uttrycks i förhållande till den negativa kontrollens/lösningssmedelskontrollens kloningseffektivitet (Clive och Spector, 1975).

S9-leverfraktion: supernatant av leverhomogenat efter centrifugering vid 9 000g, dvs. råleverextrakt.

S9-blandning: blandning av S9-leverfraktion och kofaktorer som krävs för metabolisk enzymaktivitet.

Suspensionstillväxt: x-faldig ökning av antalet celler under behandlingens gång och expressionsfaserna i MLA. Suspensionstillväxten beräknas genom att den x-faldiga ökningen på dag 1 multipliceras med den x-faldiga ökningen på dag 2 för den kortvariga behandlingsperioden (tre eller fyra timmar). Om 24-timmarsbehandling används motsvarar suspensionstillväxten den x-faldiga ökningen under 24-timmarsbehandlingen, multiplicerat med de x-faldiga ökningarna under expressionsdagarna 1 och 2.

Lösningssmedelskontroll: Allmän term för att definiera kontrollodlingar som endast tillsatts det lösningssmedel som används för att lösa upp testkemikalien.

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

Obehandlade kontroller: odlingar som inte behandlas (dvs. varken testkemikalie eller lösningssmedel tillförs), men som behandlas på samma sätt som de odlingar där testkemikalien tillförs.

Tillägg 2

FORMLER

Cytotoxicitet

För båda versionerna (agar och mikrotiterplatta) av MLA

Cytotoxicitet definieras som relativ total tillväxt (RTG), vilket omfattar relativ suspensionstillväxt (RSG) under expressionsperioden på två dagar och relativ kloningseffektivitet (RCE), som erhållits vid tidpunkten för mutanturvalet. RTG, RSG och RCE uttrycks i procent.

Beräkning av RSG: Suspensionstillväxt ett (SG_1) är tillväxttakten mellan dag 0 och dag 1 (cellkoncentration på dag 1/cellkoncentration på dag 0), och suspensionstillväxt två (SG_2) är tillväxttakten mellan dag 1 och dag 2 (cellkoncentration på dag 2/cellkoncentration på dag 1). RSG är den totala suspensionstillväxten ($SG_1 \times SG_2$) för den behandlade odlingen jämfört med den obehandlade kontrollen/lösningssmedelskontrollen. Det innebär följande: $RSG = [SG_{1(test)} \times SG_{2(test)}] / [SG_{1(kontroll)} \times SG_{2(kontroll)}]$. SG_1 bör beräknas från den ursprungliga cellkoncentration som användes i början av cellbehandlingen. Detta förklarar eventuell differentiell cytotoxicitet som förekommer i testodlingarna under cellbehandlingen.

RCE är testodlingens relativa kloningseffektivitet jämfört med kloningseffektiviteten hos den obehandlade kontroll/lösningssmedelskontroll som erhållits vid tidpunkten för mutanturvalet.

Relativ total tillväxt (RTG): $RTG = RSG \times RCE$

TK6

Relativ överlevnad (RS):

Cytotoxicitet bedöms genom den relativa överlevnaden, dvs. kloningseffektiviteten för celler som överförts till platta omedelbart efter behandling justerat utifrån eventuell cellförlust under behandlingen jämfört med kloningseffektiviteten i negativa kontroller (som tilldelas en överlevnadskvot på 100 %). Justeringen för cellförlust under behandlingen kan beräknas som

$$\text{Justerad CE} = CE \times \frac{\text{Antal celler när behandlingen avslutas}}{\text{Antal celler när behandlingen inleds}}$$

RS för celler som behandlats av en testkemikalie beräknas på följande sätt:

$$RS = \frac{\text{Justerad CE i den behandlade odlingen}}{\text{Justerad CE i lösningssmedelskontrollen}} \times 100$$

Mutantfrekvens för både MLA och TK6

Mutantfrekvensen (MF) är kloningseffektiviteten hos mutantkolonier i ett selektivt medium (CE_M) justerat med kloningseffektiviteten i ett icke-selektivt medium vid tidpunkten för mutanturvalet (CE_V). Det vill säga, $MF = CE_M / CE_V$. Beräkningen av kloningseffektivitet beskrivs nedan för kloningsmetoderna med agar och mikrotiterplatta.

Agarversionen av MLA: I mjukagarversionen av MLA erhålls antalet kolonier på plattan för mutanturvalet (C_M) och antalet kolonier på plattan för icke utvalda kolonier eller kloningseffektivitet (viabilitetsräkning) (C_V) genom att klonerna räknas direkt. När 600 celler överförs för kloningseffektivitet (CE) till plattorna för mutanturvalet (CE_M) och plattorna för icke utvalda kolonier eller kloningseffektivitet (viabilitetsräkning) (CE_V) och 3×10^6 celler används för mutanturval,

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

Mikrotiterversionen av MLA och TK6: I mikrotiterversionen av MLA C_M och C_V bestäms som produkten av det totala antalet hål (TW) och det förmodade antalet kolonier per hål (P) på mikrotiterplattorna.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Från nolltermen i Poissonfördelningen (Furth et al., 1981), P ges genom

$$P = - \ln (EW / TW)$$

där EW är tomma hål och TW totalt antal hål. Därför

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

För mikrotiterversionen av MLA beräknas mutantfrekvenserna för små och stora kolonier på samma sätt, med användning av antalet tomma hål för små och stora kolonier.

För TK6 baseras mutantfrekvenserna för små och stora kolonier på tidigt och sent uppträdande mutanter.

B.68 TESTMETOD FÖR KORTTIDSEXPONERING IN VITRO FÖR IDENTIFIERING AV i) KEMIKALIER SOM ORSAKAR ALLVARLIG ÖGONSKADA OCH ii) KEMIKALIER FÖR VILKA DET INTE KRÄVS KLASSIFICERING FÖR ÖGONIRRITATION ELLER ALLVARLIG ÖGONSKADA

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 491 (2017). Testmetoden korttidsexponering (STE) är en testmetod in vitro som kan användas under särskilda omständigheter och med specifika begränsningar för faroklassificering och märkning av kemikalier (ämnen och blandningar) som orsakar allvarlig ögonskada och kemikalier för vilka det inte krävs klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada, enligt definitionen i FN:s globala harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (1) och förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP)¹.
2. I många år har kemikaliers eventuella skadliga verkan på ögonen huvudsakligen utvärderats med hjälp av ett in vivo-test på kaninögon (TM B.5 (8), motsvarande OECD TG 405). Det är allmänt vedertaget att inget enskilt alternativt in vitro-test inom överskådlig framtid kommer att fullständigt kunna ersätta in vivo-testet på kaninögon för att förutsäga alla typer av allvarlig ögonskada/ögonirritation för olika kemiska klasser. Emellertid kan strategiska kombinationer av alternativa testmetoder som används i en (stegvis) teststrategi mycket väl fullständigt ersätta testet på kaninögon (2). Top-down-strategin är utformad för testning av kemikalier som baserat på befintlig information kan förväntas vara mycket irriterande eller orsaka allvarlig ögonskada. Bottom-up-strategin är däremot utformad för testning av kemikalier som baserat på befintlig information inte förväntas orsaka tillräcklig ögonirritation för att kräva en klassificering. STE-testmetoden anses inte vara en fullständig ersättning för in vivo-testet på kaninögon, men är lämplig för användning som en del av en stegvis teststrategi för lagstadgad klassificering och märkning, såsom top-down-strategin/bottom-up-strategin, för att utan ytterligare testning identifiera i) kemikalier som inducerar allvarlig ögonskada (GHS/CLP-kategori 1), och ii) för kemikalier (exklusive mycket flyktiga ämnen och alla fasta kemikalier utom ytaktiva ämnen) som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada enligt (GHS/CLP Ingen klassificering) (1)(2). Kemikalier som inte förutsägs orsaka allvarlig ögonskada

¹ 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).

(GHS/CLP-kategori 1) och inte heller inducerar allvarlig ögonskada eller ögonirritation (GHS/CLP Ingen klassificering) enligt STE-testmetoden kräver dock ytterligare testning för att fastställa en definitiv klassificering. Dessutom bör berörda tillsynsmyndigheter rådfrågas innan man använder STE-metoden inom ramen för en bottom-up-strategi enligt andra klassificeringssystem än GHS/CLP. Valet av lämpligaste testmetod och användningen av denna testmetod bör övervägas mot bakgrund av OECD:s vägledningsdokument om ett integrerat synsätt på testning och bedömning av allvarlig ögonskada och ögonirritation (14).

3. Syftet med denna testmetod är att beskriva de förfaranden som används för att utvärdera om en testkemikalie kan vara skadlig för ögonen, baserat på dess förmåga att inducera cytotoxicitet i testmetoden för korttidsexponering. Kemikaliers cytotoxiska effekt på hornhinnans epitelceller är ett viktigt verkningssätt som leder till skada på hornhinnans epitel och ögonirritation. Cellviabiliteten i STE-testmetoden bedöms, efter extraktion av cellerna, med hjälp av en kvantitativ mätning av blått formazansalt, som produceras av de levande cellerna genom enzymatisk omvandling av vitalfärgämnet MTT (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid), även benämnt tiazolylblått-tetrazoliumbromid (3). Den cellviabilitet som erhålls jämförs med lösningsmedelskontrollen (relativ viabilitet) och används för att uppskatta testkemikalies eventuella skadliga effekt på ögonen. En testkemikalie klassificeras som GHS/CLP-kategori 1 när både koncentrationerna på 5 % och 0,05 % leder till en cellviabilitet som är lägre än eller motsvarar ($\leq$) 70 %. Omvänt klassificeras en testkemikalie som GHS/CLP Ingen klassificering när både koncentrationerna på 5 % och 0,05 % leder till en cellviabilitet som är högre än ($\leq$) 70 %.
4. I denna metod avser begreppet ”testkemikalie” endast testade kemikalier. Frågan om huruvida STE-testmetoden är tillämplig på testning av ämnen och/eller blandningar tas inte upp här. Definitioner av begreppen finns i tillägg 2.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

5. Denna testmetod är baserad på ett protokoll som utvecklats av Kao Corporation (4), som var föremål för två olika valideringsstudier: den ena av Validation Committee of the Japanese Society for Alternative to Animal Experiments (JSAAE) (5) och den andra av Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) (6). En sakkunnigbedömning utfördes av NICEATM/ICCVAM baserat på rapporterna om valideringsstudierna och bakgrundsgranskningsdokument om testmetoden (7).
6. Vid identifiering av kemikalier (ämnen och blandningar) som inducerar allvarlig ögonskada (GHS/CLP-kategori 1 (1) visade data som erhållits med hjälp av STE-testmetoden om 125 kemikalier (inklusive både ämnen och blandningar) en övergripande noggrannhet på 83 % (104/125), ett falskt positivt värde på 1 % (1/86), och ett falskt negativt värde på 51 % (20/39) jämfört med in vivo-testet på kaninögon

(7). Det falska negativa värde som erhållits är inte kritiskt under nuvarande omständigheter, eftersom alla testkemikalier som inducerar en cellviabilitet på $\leq 70\%$ vid en koncentration på 5% och $> 70\%$ vid en koncentration på $0,05\%$ därefter testas med andra tillbörligt validerade in vitro-testmetoder, eller som ett sista alternativ i in vivo-testet på kaninögon, beroende på kraven i tillämpliga bestämmelser, och enligt strategin med stegvis testning och de metoder för sammanvägd bedömning som för närvarande rekommenderas (1) (8). De ämnen som testades var främst monokomponentämnen, men det finns också vissa data om testning av blandningar. Testmetoden är emellertid tekniskt tillämplig på testning av multikomponentämnen och blandningar. Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man dock överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag. STE-testmetoden visade inga andra specifika brister när den användes för att identifiera testkemikalier som tillhörande GHS/CLP-kategori 1. Forskare kan överväga att använda denna testmetod för testkemikalier. I ett sådant fall bör en cellviabilitet på $\leq 70\%$ vid både koncentrationen 5% och $0,05\%$ godtas som en indikation på en respons som inducerar allvarlig ögonskada och kemikalien bör klassificeras som GHS/CLP-kategori 1 utan ytterligare testning.

7. Vid identifiering av kemikalier (ämnen och blandningar) som inte kräver klassificering för ögonirritation och allvarlig ögonskada (dvs. GHS/CLP Ingen klassificering) visade data som erhållits med hjälp av STE-testmetoden för 130 kemikalier (inklusive både ämnen och blandningar) en övergripande noggrannhet på 85% (110/130), ett falskt negativt värde på 12% (9/73), och ett falskt positivt värde på 19% (11/57) jämfört med in vivo-testet på kaninögon (7). Om mycket flyktiga ämnen och fasta ämnen som inte är ytaktiva ämnen undantas från datamängden förbättras den övergripande noggrannheten till 90% (92/102), andelen falskt negativa värden till 2% (1/54), och andelen falskt positiva värden till 19% (9/48) (7). Detta innebär att de eventuella bristerna hos STE-metoden när den används för att identifiera testkemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation och allvarlig ögonskada (GHS/CLP Ingen klassificering) är en hög andel falskt negativt värden för i) mycket flyktiga ämnen med ett ångtryck över 6 kPa , och ii) andra fasta kemikalier (ämnen och blandningar) än ytaktiva ämnen och blandningar som endast består av ytaktiva ämnen. Sådana kemikalier undantas från tillämpningsområdet för STE-testmetoden (7).
8. Förutom de kemikalier som nämns i punkterna 6 och 7 innehåller de datamängder som genererats genom STE-testmetoden även interna data om 40 blandningar, som när de jämfördes med Draizes ögontest in vivo, visade en noggrannhet på 88% (35/40), en andel falskt positiva värden på 50% (5/10), och en andel falskt negativa värden på 0% (0/30) för förutsägning av blandningar som inte kräver klassificering enligt GHS/CLP-klassificeringssystemet (9). STE-testmetoden kan därför användas

för att identifiera blandningar som tillhörande GHS/CLP Ingen klassificering i en bottom-up-strategi, med undantag för andra fasta blandningar än fasta blandningar som endast består av ytaktiva medel, som en förlängning av metodens begränsningar avseende fasta ämnen. Blandningar som består av ämnen med ett ångtryck högre än 6 kPa bör dessutom utvärderas noggrant för att undvika eventuella underskattningar, och bör motiveras från fall till fall.

9. STE-testmetoden kan inte användas för att identifiera testkemikalier som tillhörande GHS/CLP-kategori 2 eller kategori 2A (ögonirritation) eller 2B (svag ögonirritation), eftersom många kemikalier i GHS/CLP-kategori 1 underskattas som kategori 2, 2A, eller 2B och kemikalier i GHS/CLP-kategorin Ingen klassificering överskattas som kategori 2, 2A, eller 2B (7). Därför kan det krävas ytterligare testning med en annan passande metod.
10. STE-testmetoden är lämplig för testkemikalier som löses upp eller suspenderas enhetligt i minst fem minuter i fysiologisk saltlösning, 5 % dimetylsulfoxid (DMSO) i saltlösning eller mineralolja. STE-testmetoden är inte lämplig för testkemikalier som är olösliga eller inte kan suspenderas enhetligt i minst fem minuter i fysiologisk saltlösning, 5 % dimetylsulfoxid (DMSO) i saltlösning eller mineralolja. Det är möjligt att använda mineralolja i STE-testmetoden på grund av den korta tidsexponeringen. STE-testmetoden är därför lämplig för att förutsäga vattenlösliga testkemikaliers skadliga verkan på ögonen (t.ex. långkedjiga fettalkoholer eller ketoner), förutsatt att de är lösliga i minst ett av de tre lösningsmedel som föreslås ovan (4).
11. I denna metod avser begreppet ”testkemikalie” endast testade kemikalier¹¹. Frågan om huruvida DPRA är tillämplig på testning av ämnen och/eller blandningar tas inte upp här.

TESTPRINCIP

12. STE-testmetoden är ett cytotoxicitetsbaserad in vitro-test som utförs på ett konfluent monolager av celler från kaniners hornhinna (SIRC-celler) från Statens Seruminstitut, som odlats på en 96-håls mikrotiterplatta av polykarbonat (4). Efter fem minuters exponering för testkemikalien mäts cytotoxiciteten kvantitativt som SIRC-cellernas relativa viabilitet, med användning av MTT-testet (4). Minskad cellviabilitet används för att förutsäga eventuellt negativa effekter som leder till ögonskador.

¹ I juni 2013 enades det gemensamma mötet om att begreppet testkemikalier när så är möjligt bör användas mer konsekvent för att beskriva vad som testas, vilket nu bör tillämpas på nya och uppdaterade testmetoder.

13. Det har rapporterats att 80 % av en lösning som droppas in i ett kaninöga utsöndras via konjunktivalsäcken inom tre till fyra minuter, medan mer än 80 % av en lösning som droppas in i en människa öga utsöndras inom en till två minuter (10). STE-metoden försöker närma sig dessa exponeringstider och använder cytotoxicitet som en endpoint för att bedöma graden av skada på SIRC-cellerna efter fem minuters exponering för testkemikalien.

DEMONSTRATION AV KOMPETENS

14. Före rutinanvändning av STE-testmetoden enligt beskrivningen i denna testmetod bör laboratoriet visa teknisk kompetens genom att korrekt klassificera de elva ämnen som rekommenderas i tabell 1. Dessa ämnen valdes för att representera hela responsintervallet för allvarlig ögonskada eller ögonirritation baserat på resultat från in vivo-tester på kaninöga (TG 405) och GHS/CLP-klassificeringssystem (1). Till övriga kriterier hör att ämnena ska vara kommersiellt tillgängliga, att det finns tillgång till in vivo-referensdata av hög kvalitet och att det finns in vivo-data av hög kvalitet från STE-testmetoden (3). När en listad kemikalie inte finns tillgänglig eller när det är motiverat kan en annan kemikalie som det finns adekvata in vivo- och in vitro-referensdata för användas, förutsatt att samma kriterier tillämpas som de som beskrivs här.

Tabell 1: Förteckning över kvalifikationsämnena

Ämne	CAS-nr	Kemisk klass ¹	Fysikaliskt tillstånd	In vivo GHS/CLP-kategori ²	Lösningsmedel i STE-testet	STE GHS/CLP kategori
Bensalkoniumklorid (10 %, vattenbaserad)	8001-54-5	Oniumförening	Vätska	Kategori 1	Saltlösning	Kategori 1
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Eter	Vätska	Kategori 1	Saltlösning	Kategori 1
Acid Red 92	18472-87-2	Heterocyklisk förening, bromförening, klorförening	I fast form	Kategori 1	Saltlösning	Kategori 1
Natriumhydroxid	1310-73-2	Alkali, oorganisk kemikalie	I fast form	Kategori 1 ³	Saltlösning	Kategori 1
Butyrolakton	96-48-0	Lakton Heterocyklisk förening	Vätska	Kategori 2A (kategori 2 i CLP)	Saltlösning	Ingen förutsägelse kan göras
1-Oktanol	111-87-5	Alkohol	Vätska	Kategori 2A /B ⁴ (kategori 2 i CLP)	Mineralolja	Ingen förutsägelse kan göras

Cyklopentanol	96-41-3	Alkohol, kolväte (cykliskt)	Vätska	Kategori 2A/B ⁵ (kategori 2 i CLP)	Saltlösning	Ingen förutsägelse kan göras
2-etoxyetylacetat	111-15-9	Alkohol, Eter	Vätska	Ingen klassificering	Saltlösning	Ingen klassificeri ng
Dodekan	112-40-3	Kolväte, acykliskt	Vätska	Ingen klassificering	Mineralolja	Ingen klassificeri ng
Metylisobutylketon	108-10-1	Keton	Vätska	Ingen klassificering	Mineralolja	Ingen klassificeri ng
n,n- dimetylguanidinsulf at	598-65-2	Amidin, svavelförenin g	I fast form	Ingen klassificering	Saltlösning	Ingen klassificeri ng

Förkortningar: CAS-nr = Chemical Abstracts Service Registry Number

¹ De kemiska klasserna tilldelades med användning av information som inhämtats från tidigare NICEATM-publikationer och om sådana inte finns tillgängliga, med användning av National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH[®]) (via ChemIDplus[®] [National Library of Medicine], se <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>) samt strukturbestämningar som fastställts av NICEATM.

² På grundval av in vivo-test på kaninögon (OECD TG 405) och med användning av GHS/CLP (1).

³Klassificering som kategori 1 baseras på hudfrätande potential hos 100 % natriumhydroxid (förtecknad som en kvalifikationskemikalie med hudfrätande potential i OECD TG 435) och kriteriet för GHS/CLP-kategori 1 (1).

⁴Klassificering i kategori 2A eller 2B beror på tolkningen av GHS-kriteriet för att skilja mellan dessa två kategorier, dvs. 2 av 6 jämfört med 4 av 6 djur med effekter på dag 7, vilket krävs för en klassificering i kategori 2A. In vivo-datamängden omfattade två studier med tre djur var. I den ena studien visade 2 av 3 djur effekter på dag 7, vilket föranledde en kategori 2-klassificering (11). I den andra studien återhämtade sig alla endpoints hos samtliga 3 djur till en poäng på noll till dag 7, vilket föranledde en kategori 2B-klassificering (12).

⁵Klassificering i kategori 2A eller 2B beror på tolkningen av GHS-kriteriet för att skilja mellan dessa två kategorier, dvs. 1 av 3 jämfört med 2 av 3 djur med effekter på dag 7, vilket krävs för en klassificering i kategori 2A. In vivo-undersökningen omfattade tre djur. Alla endpoints utom korneaopacitet och konjunktival rodnad hos ett djur återhämtades till noll dag 7 eller tidigare. Det djur som inte hade återhämtat sig fullständigt dag 7 hade en korneaopacitet på 1 och en konjunktival rodnad på 1 (dag 7) som var fullständigt återställd dag 14 (11).

FÖRFARANDE

Beredning av cellmonolager

15. SIRC, cellinjen från kaniners hornhinna, bör användas i STE-testmetoden. Det rekommenderas att SIRC-cellerna erhålls från en väl kvalificerad cellbank, såsom American Type Culture Collection CCL60.
16. SIRC-celler odlas vid 37 °C under 5 % CO₂ i en fuktad atmosfär i en odlingskolv som består av Eagle's minimum essential medium (MEM), kompletterad med 10 % fetalt bovins serum (FBS), 2 mM L-glutamin, 50–100 enheter/ml penicillin och 50–100 µg/ml streptomycin. Celler som har blivit konfluenta i odlingskolven bör avskiljas med användning av etylendiamintetraättiksyralösning, med eller utan cellskrapa. Cellerna förökas (t.ex. 2 till 3 passager) i en odlingskolv innan de används för rutintestning, och bör inte genomgå fler än 25 passager från upptining.

17. Celler som är färdiga att användas för STE-testet bereds sedan i lämplig täthet och sås i 96-hålsplattor. Rekommenderad täthet för cellsådden är $6,0 \times 10^3$ celler per hål om cellerna används fyra dagar efter sådd eller $3,0 \times 10^3$ celler per hål när de används fem dagar efter sådd, vid en odlingsvolym på 200 µl. Celler som används för STE-testet och sås i ett odlingsmedium i lämplig täthet kommer att uppnå en konfluens på mer än 80 % vid testningstillfället, dvs. fyra eller fem dagar efter sådd.

Applicering av testkemikalier och kontrollämnen

18. Förstahandsvalet för lösningsmedel för att lösa upp eller suspendera testkemikalierna är fysiologisk saltlösning. Om testkemikalien uppvisar låg löslighet eller inte kan lösas upp eller suspenderas på ett enhetligt sätt i minst fem minuter i saltlösning används 5 % DMSO (CAS-nr 67-68-5) i saltlösning som andrahandsval. För testkemikalier som inte kan lösas upp eller suspenderas på ett enhetligt sätt i minst fem minuter i varken saltlösning eller 5 % DMSO i saltlösning används mineralolja (CAS-nr 8042-47-5) som tredjehandsval.
19. Testkemikalier löses upp eller suspenderas enhetligt i det valda lösningsmedlet i en koncentration med ett massförhållande på 5 % och späds ytterligare genom 10-faldig seriespädning till koncentrationer på 0,5 % och 0,05 %. Varje testkemikalie ska testas både vid koncentrationer på 5 % och 0,05 %. De celler som odlats i 96-hålsplattan exponeras för 200 µl/hål av antingen en koncentration på 5 % eller 0,05 % av lösningen (eller suspensionen) av testkemikalien i fem minuter vid rumstemperatur. Testkemikalierna (monokomponentämnen eller multikomponentämnen eller blandningar) anses vara rena och späds eller suspenderas enligt metoden, oavsett renhetsgrad.
20. Det odlingsmedium som beskrivs i punkt 16 används som mediumkontroll i varje platta av varje repetition. Cellerna ska även exponeras för prover av lösningsmedelskontrollen i varje platta av varje repetition. Det har bekräftats att de lösningsmedel som anges i punkt 18 inte har några negativa effekter på SIRC-cellernas viabilitet.
21. I STE-testmetoden ska 0,01 % natriumlaurylsulfat (SLS) i saltlösning användas som positiv kontroll i varje platta av varje repetition. För att beräkna cellviabiliteten i den positiva kontrollen måste varje platta av varje repetition även innehålla en lösningsmedelskontroll med saltlösning.
22. Ett blankprov är nödvändigt för att bestämma compensationen för den optiska densiteten, och bör utföras på hål som endast innehåller fosfatbuffrad saltlösning, men inte kalcium eller magnesium (PBS-) eller celler.
23. Varje prov (testkemikalien vid 5 % och 0,05 %, mediumkontroll, lösningsmedelskontroll och positiv kontroll) bör testas i triplikat i varje repetition

genom att cellerna exponeras för 200 µl av en lämplig test- eller kontrollkemikalie i fem minuter vid rumstemperatur.

24. Referensämnen kan användas för utvärdering av förmågan att framkalla ögonirritation hos okända kemikalier tillhörande en specifik kemisk klass eller produktklass, eller för utvärdering av den relativa irritationspotentialen hos ett ögonirriterande ämne inom ett specifikt responsområde.

Mätning av cellviabilitet

25. Efter exponering tvättas cellerna två gånger med 200 µl PBS och 200 µl MTT-lösning (0,5 mg MTT/ml av odlingsmediet) tillsätts. Efter en reaktionstid på två timmar i en inkubator (37 °C, 5 % CO₂) dekanteras MTT-lösningen, MTT-formazan extraheras genom tillsats av 200 µl 0,04 N saltsyra-isopropanol i 60 minuter i mörker vid rumstemperatur, och MTT-formazanlösningens absorbans mäts vid 570 nm med en plattläsare. Testkemikaliernas störningar av MTT-testet (genom färgämnen eller direkt MTT-reduktion) inträffar endast om en betydande mängd av testkemikalien stannar kvar i testsystemet efter sköljning efter exponering, vilket är fallet med 3D-rekonstruerad human hornhinna eller rekonstruerad human epidermisvävnad, men är inte relevant för de 2D-celldodlingar som används för STE-testmetoden.

Tolkning av resultaten och prediktionsmodell

26. De värden för den optiska densiteten (OD) som erhållits för varje testprov används sedan för att beräkna cellviabilitet i förhållande till lösningsmedelskontrollen, som sätts till 100 %. Relativ cellviabilitet uttrycks som en procentenhet och erhålls genom att testkemikaliens OD divideras med lösningsmedelskontrollens OD efter att blankprovets OD har subtraherats från båda värdena.

$$\text{Cellviabilitet (\%)} = \frac{(OD_{570} \text{ för testkemikalien}) - (OD_{570} \text{ för blank})}{(OD_{570} \text{ för lösningsm. kontr.}) - (OD_{570} \text{ för blank})} \times 100$$

Relativ cellviabilitet för varje lösningsmedelskontroll uttrycks likaså som en procentenhet och erhålls genom att varje lösningsmedelskontrolls OD divideras med odlingsmediets OD efter att blankprovets OD har subtraherats från båda värdena.

27. Tre oberoende repetitioner, som var och en innehåller tre replikathål (dvs., n = 9), bör utföras. Det aritmetiska medelvärdet för de tre hålen för varje testkemikalie och lösningsmedelskontroll i varje oberoende repetition används för att beräkna det aritmetiska medelvärdet för relativ cellviabilitet. Det slutliga aritmetiska medelvärdet för cellviabiliteten beräknas från de tre oberoende repetitionerna.
28. Cellviabilitetens brytpunktsvärden för att identifiera testkemikalier som framkallar allvarliga ögonskador (GHS/CLP-kategori 1) och testkemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarliga ögonskador (GHS/CLP Ingen klassificering) ges nedan:

Tabell 2: Prediktionsmodell för STE-testmetoden

Cellviabilitet		Klassificering enligt GHS/CLP	Tillämplighet
vid 5 %	vid 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Ingen klassificering	Ämnen och blandningar, med undantag för i) mycket flyktiga ämnen med ett ångtryck över 6 kPa ¹ , och ii) fasta kemikalier (ämnen och blandningar), andra än ytaktiva medel och blandningar som endast består av ytaktiva medel.
≤ 70 %	> 70 %	Ingen förutsägelse kan göras	Ej tillämpligt
≤ 70 %	≤ 70 %	Kategori 1	Ämnen och blandningar ²

¹ Blandningar som består av ämnen med ett ångtryck högre än 6 kPa bör dessutom utvärderas noggrant för att undvika eventuella underskattningar, och bör motiveras från fall till fall.

² Baserat på resultat som huvudsakligen uppnått med monokomponentämnena, men det finns också vissa data om testning av blandningar. Testmetoden är emellertid tekniskt tillämplig på testning av multikomponentämnena och blandningar. Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag.

Acceptanskriterier

29. Testresultaten anses vara godtagbara om samtliga följande kriterier är uppfyllda:

- Mediumkontrollens optiska densitet (exponerat för odlingsmediet) bör vara 0,3 eller högre efter det att blankprovets optiska densitet har subtraherats.
- Lösningsmedelskontrollens viabilitet bör vara 80 % eller högre i förhållande till mediumkontrollen. Om flera lösningsmedelskontroller används i varje repetition bör var och en av dessa kontroller uppvisa en cellviabilitet större än 80 % för att testkemikalierna ska kunna testas med dessa lösningsmedel.
- Den cellviabilitet som erhålls med den positiva kontrollen (0,01 % SLS) bör ligga inom två standardavvikelser från det historiska medelvärdet. De högre och lägre acceptansgränserna för den positiva kontrollen bör uppdateras ofta, dvs. var tredje månad eller varje gång ett godtagbart test utförs i laboratorier där tester utförs sällan (dvs. mindre än en gång i månaden). Om ett laboratorium inte slutför ett tillräckligt antal försök för att kunna fastställa en statistiskt robust fördelning av de positiva kontrollerna är det godtagbart att de högre och lägre acceptansgränser som har fastställts av metodutvecklaren används, dvs. mellan 21,1 % och 62,3 % enligt laboratoriets historiska data, medan en intern fördelning byggs upp under de första rutintesterna.

- d) Standardavvikelsen för den slutliga cellviabilitet som härletts från tre oberoende repetitioner bör vara mindre än 15 % både för koncentrationen på 5 % och 0,05 % av testkemikalien.

Om ett eller flera av dessa kriterier inte är uppfyllt bör resultaten förkastas och ytterligare tre oberoende repetitioner utföras.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

30. Data för varje individuellt hål (t.ex. cellviabilitetsvärden) för varje repetition samt totalt medelvärde, SD och klassificering ska rapporteras.

Testrapport

31. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie och kontrollämnen

- Monokomponentämne: kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel och/eller andra identifieringar.
- Multikomponentämne, UVCB-ämne och blandning: Karakteriseras så långt som möjligt genom t.ex. kemisk beteckning (se ovan), renhet, kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper (se ovan) hos beståndsdelarna, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- – Fysikaliskt tillstånd, flyktighet, pH, LogP, molekylärvikt, kemisk klass samt ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper som är relevanta för utförandet av studien, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Renhet, kemisk beteckning för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.
- Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).
- Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

Testmetodens betingelser och förfaranden

- Namn och adress för sponsor, testanläggning och försöksledare.
- Beskrivning av använd testmetod.
- Använd cellinje, dess källa, antal passager och konfluens för de celler som använts för testningen.
- Detaljerade uppgifter om försöksförfarandet.

- Antal repetitioner och replikat.
 - Använda koncentrationer av testkemikalierna (om andra koncentrationer än de rekommenderade har använts).
 - Motivering för valet av lösningsmedel för varje testkemikalie.
 - Varaktighet för exponeringen för testkemikalien (om en annan exponeringstid än den rekommenderade har använts).
 - Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet.
 - Beskrivning av utvärderings- och beslutskriterierna.
 - Hänvisning till historiska medelvärden för positiva kontroller samt standardavvikelse (SD).
- Demonstration av att laboratoriet är kompetent att tillämpa testmetoden (t.ex. genom testning av kvalifikationsämnen) eller för att visa att testmetoden kan reproduceras över tiden.

Resultat

- För varje testkemikalie och kontrollämne och för varje testad koncentration bör följande anges i tabellform: individuella OD-värden per replikathål, aritmetiskt medelvärde för OD-värdena för varje oberoende repetition, cellviabilitet uttryckt i procent för varje oberoende repetition och det slutliga aritmetiska medelvärdet för cellviabilitet och SD över de tre repetitionerna.
- Resultat för mediumkontrollen, lösningsmedelskontrollen och den positiva kontrollen, som visar lämpliga acceptanskriterier för studien.
- Beskrivning av övriga observerade effekter.
- Övergripande härledda klassificeringar med hänvisning till prediktionsmodell och/eller beslutskriterier.

Diskussion av resultaten

Slutsatser

LITTERATUR

- (1) Förenta nationerna (FN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Se http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) Scott, L., et al. (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1–9.
- (3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- (4) Takahashi Y., et al. (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22, 760–770.
- (5) Sakaguchi H., et al. (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25, 796–809.
- (6) Kojima H., et al. (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, s. 1855–1869.
- (7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Se [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].
- (8) Kapitel B.5 i denna bilaga, Akut ögonirritation/ögonkorrosion.
- (9) Saito K, et al. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.
- (10) Mikkelsen T.J., Chrai S.S. och Robinson J.R. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm. Sci.* 1648–1653.
- (11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report nr 48. (2)), Bryssel, Belgien

- (12) Gautheron P, et al. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. *Fundam Appl Toxicol.* 18, s. 442–449.
- (13) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 34). Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.
- (14) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 263). Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.

Tillägg

DEFINITIONER

Noggrannhet: anger hur väl testresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Det är ett mått på testmetodens prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (13).

Referensämne: ett ämne som används som standard för jämförelse med en testkemikalie. Ett referensämne ska ha följande egenskaper: i) En eller flera enhetliga och tillförlitliga källor. ii) Strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas iii) Kända fysikaliska/kemiska egenskaper, stödjande data om kända effekter och v) känd styrka inom det önskade responsområdet.

Bottom-up-strategi: en stegvis metod som tillämpas på testkemikalier som inte tros kräva klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada. Det första steget är att skilja kemikalier som inte behöver klassificeras (negativt utfall) från andra kemikalier (positivt utfall).

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Ögonirritation: ändring som uppstår i ögat efter applicering av en testkemikalie på ögats främre yta och som inte är fullt reversibla inom 21 dagar från appliceringen. Utbytbar med ”reversibla effekter på ögat” och GHS/CLP kategori 2.

Andel falskt negativa värden: den andel av alla positiva ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som negativ. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

Andel falskt positiva värden: den andel av alla negativa (icke-aktiva) ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som positiva. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

Fara: inneboende egenskap hos ett ämne eller en situation som har potential att orsaka skadliga effekter när en organism, ett system eller en (del)population exponeras för ämnet.

Mediumkontroll: ett obehandlat replikat som innehåller alla komponenter i ett testsystem. Detta prov hanteras tillsammans med testkemikaliebehandlade prover och andra kontrollprover för att avgöra huruvida lösningsmedlet påverkar testsystemet.

Blandning: blandning eller lösning som består av två eller flera ämnen.

Monokomponentämne: ett ämne, definierat av sin kvantitativa sammansättning, där minst en huvudsaklig beståndsdel utgör minst 80 viktprocent.

MTT: 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid, tiazolylblått-tetrazoliumbromid.

Multikomponentämne: ett ämne, definierat av sin kvantitativa sammansättning, där fler än en huvudsaklig beståndsdel förekommer i en koncentration på ≥ 10 viktprocent och < 80 viktprocent. Ett multikomponentämne är resultatet av en tillverkningsprocess. Skillnaden mellan blandningar och multikomponentämnena är att en blandning erhålls genom att två eller flera ämnen blandas utan kemisk reaktion. Ett multikomponentämne är resultatet av en kemisk reaktion.

OD: optiska densitetsnivåer.

Positiv kontroll: ett replikat som innehåller testsystemets alla komponenter och behandlas med ett ämne som veterligen inducerar positiv respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsens variationer kan bedömas över tiden, bör den kraftiga irritation som framkallas inte vara överdriven.

Relevans: beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida detta förhållande är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl man genom testet korrekt kan mäta och förutse den biologiska effekten det gäller. Relevans omfattar också överväganden om en testmetods noggrannhet (konkordans) (10).

Tillförlitlighet: mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när den utförs med hjälp av samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier och repeterbarheten inom laboratorier (13).

Sensitivitet: den andel av alla positiva/aktiva kemikalier som klassificeras korrekt i testet. Det är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (10).

Allvarliga ögonskador: vävnadsskada i ögat eller kraftig synnedsättning som uppstår efter applicering av en testkemikalie på ögats främre yta och som inte är fullt reversibel inom 21 dagar från appliceringen (2). Utbytbar med ”irreversibla effekter på ögat” och GHS/CLP kategori 1.

Lösningsmedels-/vehikelkontroll: ett obehandlat prov som innehåller testsystemets alla komponenter, inbegripet lösningsmedlet eller vehikeln som behandlas tillsammans med testkemikaliebehandlade och andra kontrollprover i syfte att fastställa bakgrundsrespons för de prover som behandlas med testkemikalien upplöst i samma lösningsmedel eller vehikel. När detta prov testas med en parallell mediumkontroll, visar provet också huruvida lösningsmedlet eller vehikeln påverkar testsystemet.

Specificitet: den andel av alla negativa/inaktiva kemikalier som klassificeras korrekt i testet. Det är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (13).

Ämne: kemiskt grundämne och föreningar av detta grundämne i naturlig eller tillverkad form, inklusive de eventuella tillsatser som är nödvändiga för att bevara dess stabilitet och sådana föroreningar som härrör från tillverkningsprocessen, men

exklusive eventuella lösningsmedel som kan avskiljas utan att det påverkar ämnets stabilitet eller ändrar dess sammansättning.

Ytaktivt ämne: en kemikalie, såsom ett rengöringsmedel, som kan minska en vätskas ytspänning så att lödder bildas eller fasta ämnen penetrerar. Även kallat tensid eller vätmedel.

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

Stegvis teststrategi: en strategi för stegvis testning där all befintlig information om en testkemikalie granskas i en angiven ordning, med användning av förfarandet med sammanvägd bedömning (*weight of evidence*) för att avgöra om det finns tillräckligt med information till hands för att besluta om faroklassificering innan man går vidare till nästa steg. Om testkemikalien förmåga att framkalla irritation kan fastställas på grundval av befintlig information behövs ingen ytterligare testning. Om testkemikalien förmåga att framkalla irritation inte kan fastställas på grundval av befintlig information genomförs ett stegvis sekventiellt djurförsöksförfarande tills att det går att fastställa en otvetydig klassificering.

Top-down-strategi: stegvis metod som tillämpas på testkemikalier som misstänks orsaka allvarlig ögonskada. Det första steget är att skilja kemikalier som inducerar allvarlig ögonskada (positivt utfall) från andra kemikalier (negativt utfall).

FN:s globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS): ett system för att klassificera ämnen och blandningar enligt standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker och informera om resultaten genom t.ex. piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad i syfte att informera om ämnenas skadliga effekter för att skydda personer (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) och miljön (1).

GHS/CLP-kategori 1: se ”allvarliga ögonskador”.

GHS/CLP-kategori 2: se ”ögonirritation”.

GHS/CLP Ingen klassificering: Kemikalier som inte är klassificerade enligt GHS/CLP-kategori 1 eller 2 (eller 2A eller 2B).

UVCB-ämne: ämne med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter och biologiskt material.

B.69 TESTMETOD MED REKONSTRUERAT HUMANT HORNHINNELIKT EPITEL (RhCE) FÖR IDENTIFIERING AV KEMIKALIER SOM INTE KRÄVER KLASSIFICERING ELLER MÄRKNING FÖR ÖGONIRRITATION ELLER ALLVARLIG ÖGONSKADA

INLEDNING

1. Denna testmetod (TM) motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 492 (2017). *Allvarlig ögonskada* avser vävnadsskada i ögat eller kraftig synnedsättning som uppstår efter applicering av en testkemikalie på ögats främre yta och som inte är fullt reversibel inom 21 dagar från appliceringen, så som definierat enligt FN:s globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (1) och förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP-förordningen)¹. Likaså avses med *ögonirritation*, enligt GHS och CLP-förordningen, ändringar som uppstår i ögat efter applicering av en testkemikalie på ögats främre yta och som är fullt reversibla inom 21 dagar från appliceringen. Testkemikalier som orsakar allvarlig ögonskada klassificeras som GHS- och CLP-kategori 1, medan de som orsakar ögonirritation klassificeras som GHS- och CLP-kategori 2. Testkemikalier som inte har klassificerats för ögonirritation eller allvarlig ögonskada definieras som de som inte uppfyller kraven för att klassificeras som GHS-respektive CLP-kategori 1 eller 2 (2A eller 2B), det vill säga de hänvisas till som GHS och CLP Ingen klassificering.
2. Bedömningen av allvarlig ögonskada/ögonirritation har vanligen inbegripit användningen av försöksdjur (TM B.5 [2]). Valet av den lämpligaste testmetoden och användningen av den här testmetoden bör ses i samband med OECD:s vägledning *Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye Irritation* (39).
3. Denna testmetod beskriver ett *in vitro*-förfarande med vilket det är möjligt att identifiera kemikalier (ämnen och blandningar) som inte behöver klassificeras och märkas för ögonirritation eller allvarlig ögonskada i enlighet med GHS och CLP-förordningen. I testet använder man sig av rekonstruerat humant hornhinnelik epitel (Reconstructed human Cornea-like Epithelium, RhCE) som imiterar det humana hornhinneepitelets histologiska, morfologiska, biokemiska och fysiologiska egenskaper. Fyra andra *in vitro*-testmetoder har validerats, bedömts vetenskapligt

¹ 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).

giltiga och antagits som TM B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) och B.68 (6) för att, med avseende på människors hälsa, undersöka hälso-endpointen allvarlig ögonskada/ögonirritation.

4. Två validerade tester där man använder sig av kommersiellt tillgängliga RhCE-modeller har inkluderats i denna testmetod. Valideringsstudier för att bedöma ögonirritation/allvarlig ögonskada har genomförts (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) med EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) och SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). Båda dessa tester använder kommersiellt tillgängliga RhCE-vävnadsmodeller som testsystem, och omnämns i nedanstående text som de Validerade referensmetoderna – VRM1 respektive VRM2. Utifrån dessa valideringsstudier och den oberoende expertgranskningen (9) (12) fann man att EpiOcular™ EIT och SkinEthic™ HCE EIT korrekt kan identifiera kemikalier (både ämnen och blandningar) som inte kräver klassificering eller märkning för ögonirritation eller allvarlig ögonskada enligt GHS, och testerna rekommenderades som vetenskapligt giltiga för det ändamålet (13).
5. Det är för närvarande allmänt vedertaget att inom överskådlig framtid kommer ingen enskild *in vitro*-testmetod helt att kunna ersätta Draizes *in vivo*-ögon-test (2) (14) för att prediktera alla typer av responser i form av allvarlig ögonskada/ögonirritation för olika kemiska klasser. Men strategiska kombinationer av flera olika testmetoder inom ramen för (differentierade) teststrategier, som nedifrån och upp-/uppifrån och ned-strategin, kan eventuellt komma att helt kunna ersätta Draizes ögon-test (15). Nedifrån och upp-strategin (15) är utformad för att användas när en kemikalie, utifrån befintlig information, inte förväntas orsaka tillräcklig ögonirritation för att kräva en klassificering, medan uppifrån och ned-strategin (15) är utformad för att användas när en kemikalie, utifrån befintlig information, förväntas orsaka allvarlig ögonskada. EpiOcular™ EIT och SkinEthic™ HCE EIT rekommenderas för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada enligt GHS/CLP-förordningen (Ingen klassificering) utan vidare tester, inom ramen för en teststrategi som nedifrån och upp eller uppifrån och ned, föreslagen av Scott m.fl., till exempel som ett första steg i en nedifrån och upp-strategi, eller som ett av de sista stegen i en uppifrån och ned-strategi (15). Men EpiOcular™ EIT och SkinEthic™ HCE EIT är inte avsedda att differentiera mellan GHS-/CLP-kategori 1 (allvarlig ögonskada) respektive kategori 2 (ögonirritation). Denna differentiering kommer att behöva undersökas i ytterligare ett steg i teststrategin (15). En testkemikalie som med EpiOcular™ EIT eller SkinEthic™ HCE EIT identifieras kräva klassificering för ögonirritation/allvarlig ögonskada kommer därför att kräva ytterligare tester (*in vitro* och/eller *in vivo*) för att nå en definitiv slutsats (GHS-/CLP-kategori Ingen klassificering, kategori 2 eller kategori 1), med användning av till exempel TM B.47, B.48, B.61 eller B.68.
6. Syftet med denna testmetod är att beskriva det förfarande som används för att utvärdera om en testkemikalie kan vara skadlig för ögonen, utifrån dess förmåga att

inducera cytotoxicitet i en RhCE-vävnadsmodell, mätt med MTT-testet (16) (se punkt 21). Viabiliteten i RhCE-vävnaden efter exponering för en testkemikalie fastställs genom jämförelse med vävnader som behandlats med negativt kontrollämne (% viabilitet) och används sedan för att prediktera om testkemikalien kan vara skadlig för ögonen.

7. Prestandastandarder (17) finns tillgängliga för att underlätta valideringen av nya eller modifierade *in vitro*-RhCE-baserade tester som liknar EpiOcular™ EIT och SkinEthic™ HCE EIT, i överensstämmelse med principerna i OECD:s vägledning nr 34 (18), och tillåta ändring av OECD TG 492 vid lämplig tidpunkt. Ömsesidigt acceptering av data (Mutual Acceptance of Data, MAD) enligt OECD-avtalet garanteras endast för tester som validerats enligt prestandastandarder, om OECD har granskat och infogat dessa tester i motsvarande testriktlinje.

DEFINITIONER

8. Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

9. Denna testmetod bygger på kommersiella tredimensionella RhCE-vävnadsmodeller som framställs från antingen primära humana epidermala keratinocyter (dvs. EpiOcular™ OCL-200) eller humana immortaliserade hornhinne-epitelceller (dvs. SkinEthic™ HCE/S). Dessa RhCE-vävnadsmodeller, EpiOcular™ OCL-200 och SkinEthic™ HCE/S, liknar hornhinnans tredimensionella epitelstruktur *in vivo* och produceras med hjälp av celler från de arter som är av intresse (19) (20). Vidare mäter testerna direkt cytotoxicitet orsakad av kemikaliens penetration av hornhinnan och framkallandet av cell- och vävnadsskada, den cytotoxiska responsen fastställer då det sammantagna utfallet av den allvarliga ögonskadan/ögonirritationen *in vivo*. Cellskada kan uppstå genom flera olika verkningsmekanismer (se punkt 20), men cytotoxiciteten spelar en viktig, om inte den främsta, mekanistiska rollen för den sammantagna responsen på en kemikalie vid en allvarlig ögonskada/ögonirritation, *in vivo* främst uttryckt genom hornhinnegrumling, irit, konjunktivarodnad och/eller kemos, oberoende av de fysikalisk-kemiska processer som ger upphov till vävnadsskadan.
10. En stor mängd kemikalier, omfattande en stor variation i kemisk typ och klass, molekylvikt, LogP-värden, kemisk struktur och så vidare har testats i den valideringsstudie som ligger till grund för denna testmetod. Valideringsdatabasen för EpiOcular™ EIT innehöll totalt 113 kemikalier, omfattande 95 olika organiska funktionella grupper enligt en QSAR-toolbox-analys från OECD (8). Majoriteten av dessa kemikalier utgjordes av monokomponentämnen, men flera multikomponentämnen (inklusive 3 homopolymerer, 5 sampolymerer och 10

kvasipolymerer) inkluderades också i studien. I fråga om fysikaliskt tillstånd och GHS-/CLP-kategorier fördelade sig de 113 testade kemikalierna som följer: 13 vätskor enligt kategori 1, 15 fasta ämnen enligt kategori 1, 6 vätskor enligt kategori 2A, 10 fasta ämnen enligt kategori 2A, 7 vätskor enligt kategori 2B, 7 fasta ämnen enligt kategori 2B, 27 vätskor enligt Ingen klassificering och 28 fasta ämnen enligt Ingen klassificering (8). Valideringsdatabasen för SkinEthic™ HCE EIT innehöll totalt 200 kemikalier, omfattande 165 olika organiska funktionella grupper (8) (10) (11). Majoriteten av dessa kemikalier utgjordes av monokomponentämnen, men flera multikomponentämnen (inklusive 10 polymerer) inkluderades också i studien. I fråga om fysikaliskt tillstånd och GHS-/CLP-kategorier fördelade sig de 200 testade kemikalierna som följer: 27 vätskor enligt kategori 1, 24 fasta ämnen enligt kategori 1, 19 vätskor enligt kategori 2A, 10 fasta ämnen enligt kategori 2A, 9 vätskor enligt kategori 2B, 8 fasta ämnen enligt kategori 2B, 50 vätskor enligt Ingen klassificering och 53 fasta ämnen enligt Ingen klassificering (10) (11).

11. Denna testmetod kan användas för ämnen och blandningar, för fasta ämnen, vätskor, halvfasta ämnen och vaxer. Vätskorna kan vara vattenbaserade eller inte, fasta ämnen kan vara lösliga eller olösliga i vatten. När det är möjligt bör ämnen i fast form pulveriseras före applicering, ingen annan förbehandling av provet krävs. Gaser och aerosoler har inte bedömts i någon valideringsstudie. Det är tänkbart att de kan testas med RhCE-teknik, men den aktuella testmetoden medger inte tester av gaser och aerosoler.
12. Testkemikalier som absorberar ljus i samma intervall som MTT-formazan (naturligt eller efter behandling) och testkemikalier som direkt kan reducera färgämnet MTT (till MTT-formazan) kan störa mätningarna av vävnadsviabilitet och kräver anpassade kontroller för korrigering. Den sorts anpassade kontroller som kan komma att krävas varierar med den typ av interferens som testkemikalien orsakar och det förfarande som används för att kvantifiera MTT-formazan (se punkterna 36–42).
13. Resultat från pre-valideringsstudier (21) (22) och fullständiga valideringsstudier (8) (10) (11) har visat att både EpiOcular™ EIT och SkinEthic™ HCE EIT kan överföras till laboratorier som kan anses vara nya i fråga om analysernas utförande, och att testerna också är reproducerbara inom och mellan laboratorier. Utifrån dessa studier kan den nivå av reproducerbarhet, uttryckt som prediktionskonkordans, som kan förväntas från EpiOcular™ EIT utifrån data om 113 kemikalier vara i storleksordningen 95 % inom laboratorier och 93 % mellan laboratorier. Nivån på reproducerbarhet, uttryckt som prediktionskonkordans, som kan förväntas från SkinEthic™ HCE EIT utifrån data om 120 kemikalier är i storleksordningen 92 % inom laboratorier och 95 % mellan laboratorier.
14. EpiOcular™ EIT kan användas för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada enligt GHS- och CLP-klassificeringssystemet. Med tanke på de data som erhöles i valideringsstudien (8), har

EpiOcular™ EIT en sammantagen exakthet på 80 % (baserat på 112 kemikalier), en känslighet på 96 % (baserat på 57 kemikalier), ett falskt negativt värde på 4 % (baserat på 57 kemikalier), en specificitet på 63 % (baserat på 55 kemikalier) och ett falskt positivt värde på 37 % (baserat på 55 kemikalier) i jämförelse med referensdata från *in vivo*-kaninögontester (TM B.5) (2) (14) klassificerat enligt GHS- och CLP-klassificeringssystemet. En studie där 97 flytande agrokemiska sammansättningar testades med EpiOcular™ EIT uppvisade resultat för denna typ av blandningar som liknade dem som erhöles i valideringsstudien (23). De 97 sammansättningarna fördelade sig som följer: 21 enligt kategori 1, 19 enligt kategori 2A, 14 enligt kategori 2B och 43 enligt Ingen klassificering, klassificerade enligt GHS-klassificeringssystemet baserat på referensdata från *in vivo*-kaninögontester (TM B.5) (2) (14). En sammantagen exakthet på 82 % (baserat på 97 sammansättningar), känslighet på 91 % (baserat på 54 sammansättningar), falskt negativt värde på 9 % (baserat på 54 sammansättningar), specificitet på 72 % (baserat på 43 sammansättningar) och falskt positivt värde på 28 % (baserat på 43 sammansättningar) erhöles (23).

15. SkinEthic™ HCE EIT kan användas för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada enligt GHS och CLP-förordningens klassificeringssystem. Med tanke på de data som erhöles i valideringsstudien (10) (11), har SkinEthic™ HCE en sammantagen exakthet på 84 % (baserat på 200 kemikalier), en känslighet på 95 % (baserat på 97 kemikalier), ett falskt negativt värde på 5 % (baserat på 97 kemikalier), en specificitet på 72 % (baserat på 103 kemikalier) och ett falskt positivt värde på 28 % (baserat på 103 kemikalier) i jämförelse med referensdata från *in vivo*-kaninögontester (TM B.5) (2) (14) klassificerat enligt GHS och CLP-förordningens klassificeringssystem.
16. De falskt negativa värden som erhöles med båda RhCE-testerna, med antingen ämnen eller blandningar, faller inom de 12 % sammantagen sannolikhet att kemikalier klassificeras antingen som GHS- och CLP-kategori 2 eller GHS- och CLP-kategori Ingen klassificering enligt Draizes *in vivo*-ögontest, i upprepade tester, detta beror på metodens inneboende inom-test-variation (24). De falskt positiva värdena som erhöles med båda RhCE-testerna med antingen ämnen eller blandningar är inte kritiskt avgörande för denna testmetod eftersom alla testkemikalier som framkallar en vävnadsviabilitet som är lika med eller lägre än de etablerade brytvärdena (se punkt 44) kommer att kräva ytterligare tester med andra *in vitro*-testmetoder, eller som ett sista alternativ på kaniner, beroende på lagkraven, med hjälp av en sekventiell teststrategi i ett tillvägagångssätt med sammanvägd bedömning. Dessa testmetoder kan användas för alla sorters kemikalier, där ett negativt resultat bör accepteras som underlag för att avstå från att klassificera kemikalien för ögonirritation och allvarlig ögonskada (GHS och CLP Ingen klassificering). Vederbörande tillsynsmyndigheter bör rådfrågas innan EpiOcular™ EIT och SkinEthic™ HCE EIT används för andra klassificeringssystem än för GHS/CLP-förordningen.

17. En begränsning hos denna testmetod är att den inte gör det möjligt att skilja mellan ögonirritation/reversibla effekter på ögat (kategori 2) och allvarliga ögonskador/irreversibla effekter på ögonen (kategori 1) som de definieras i GHS och CLP-förordningen, och inte heller mellan irriterande för ögonen (valfri kategori 2A) och milt irriterande för ögonen (valfri kategori 2B) som definieras i GHS (1). För dessa syften krävs ytterligare tester med andra *in vitro*-testmetoder.
18. Termen ”testkemikalie” används i denna testmetod för att benämna det som testas¹ och är inte kopplad till applicerbarheten hos RhCE-testmetoden för att testa ämnen och/eller blandningar.

TESTETS PRINCIP

19. Testkemikalien appliceras lokalt på minst två tredimensionella RhCE-vävnadsmodeller och vävnadsviabilitet mäts en tid efter exponering och inkubation. Dessa RhCE-vävnader rekonstrueras från primära humana epidermala keratinocyter eller humana immortaliserade hornhinne-epitelceller, vilka har odlats i flera dagar så att de har bildat ett stratifierat, högdifferentierat skivepitel med en morfologi som liknar den hos human hornhinna. EpiOcular™ RhCE-vävnadsmodellen består av minst 3 viabla cellager och en icke-keratiniserad yta, uppvisande en hornhinnelik struktur, jämförbar med den som ses *in vivo*. SkinEthic™ HCE RhCE-vävnadsmodellen består av minst 4 viabla cellager, inklusive pelarformade basalceller, övergångsformer av wing-celler och ytliga skivepitelceller som liknar dem hos normalt, humant hornhinneepitel (20) (26).
20. Kemiskt inducerad allvarlig ögonskada/ögonirritation, vilken *in vivo* främst yttrar sig som hornhinnegrumling, irit, konjunktivarodnad och/eller kemos, är resultatet av en kaskad av händelser som börjar med penetration av kemikalien genom hornhinnan och/eller bindhinnan och framkallande av cellskada. Cellskada kan uppstå genom flera olika verkningsmekanismer, inklusive lysering av cellmembran (t.ex. av ytaktiva ämnen, organiska lösningsmedel), koagulation av makromolekyler (särskilt proteiner) (t.ex. av ytaktiva ämnen, organiska lösningsmedel, alkalier och syror), saponifiering av lipider (t.ex. av alkalier), och alkylering eller annan kovalent interaktion med makromolekyler (t.ex. av blekmedel, peroxider och alkylerande ämnen) (15) (27) (28). Men det har visats att cytotoxicitet spelar en viktig, om inte den främsta, mekanistiska rollen för den sammantagna responsen på en kemikalie vid en allvarlig

¹ I juni 2013 enades det gemensamma mötet mellan OECD:s kemikaliekommitté och dess arbetsgrupp om kemikalier, bekämpningsmedel och bioteknik om att när det är möjligt bör nu en mer konsekvent användning av termen ”testkemikalie” i betydelsen ”vad som testas” tillämpas i nya och uppdaterade OECD-testriktlinjer.

ögonskada/ögonirritation, oberoende av de fysikalisk-kemiska processer som ligger till grund för skadan (29) (30). Vidare bestäms kemikaliens potential till allvarlig ögonskada/ögonirritation i princip av den inledande skadans omfattning (31), vilken korrelerar med omfattningen av celldöd (29) och med omfattningen av efterföljande responser och slutligt utfall (32). Därför påverkar lätt irriterande ämnen i allmänhet endast det ytliga hornhinneepitelet, de mildt till måttligt irriterande ämnena skadar i princip epitelet och det ytliga stromat och de kraftigt irriterande ämnena skadar epitelet, det djupa stromat och ibland hornhinnans endotel (30) (33). Mätningen av viabilitet hos RhCE-vävnaden efter lokal exponering för en testkemikalie i syfte att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för allvarlig ögonskada/ögonirritation (GHS- och CLP-kategori Ingen klassificering) grundas på antagandet att alla kemikalier som framkallar allvarlig ögonskada eller ögonirritation kommer att framkalla en cytotoxisk verkan i hornhinnans epitel och/eller bindhinna.

21. Viabiliteten hos RhCE-vävnaden mäts traditionellt genom enzymatisk omvandling av färgämnet MTT (3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazoliumbromid, tiazolylblåtetrazoliumbromid, CAS-nr 298-93-1) av vävnadens viabla celler till ett blått MTT-formazansalt som kvantifieras efter extraktion ur vävnader (16). Kemikalier som inte kräver klassificering och märkning enligt GHS/CLP-förordningen (Ingen klassificering) identifieras som de som inte minskar vävnadsviabiliteten under en definierad tröskel (dvs. vävnadsviabilitet > 60 %, i EpiOcular™ EIT och SkinEthic™ HCE EITL¹, eller > 50 %, i SkinEthic™ HCE EITS²) (se punkt 44).

UPPVISANDE AV FÄRDIGHET

22. Inför rutinmässig användning av RhCE-tester för tillsynsändamål ska laboratorier uppvisa teknisk färdighet genom att korrekt prediktera de femton kvalifikationskemikalier som anges i tabell 1. Dessa kemikalier har valts ut från de kemikalier som användes i valideringsstudierna av VRM:erna (8) (10) (11). I urvalet ingår, så långt det är möjligt, kemikalier som i) täcker olika fysikaliska tillstånd, ii) täcker hela intervallet av *in vivo*-responser av allvarlig ögonskada/ögonirritation utifrån högkvalitativa resultat från *in vivo*-referenstestet på kaninögon (TM B.5) (2) (14) och GHS-klassificeringssystemet (dvs. kategorier 1, 2A, 2B eller Ingen klassificering) (1) och CLP-klassificeringssystemet (dvs. kategorier 1, 2 eller Ingen klassificering), iii) täcker de olika pådrivande *in vivo*-faktorerna för klassificering (24)

¹ EITL: EIT för flytande ämnen med SkinEthic™ HCE.

² EITS: EIT för fasta ämnen med SkinEthic™ HCE.

(25), iv) är representativa för de kemikalieklasser som används i valideringsstudien (8) (10) (11), v) täcker ett bra, brett urval av organiska funktionella grupper (8) (10) (11), vi) har väl definierade kemiska strukturer (8) (10) (11), vii) är färgade och/eller reducerar MTT direkt, viii) gav reproducerbara resultat med RhCE-testmetoder i samband med deras validering, ix) predikterades korrekt av RhCE-testmetoder i samband med deras validering, x) täcker hela intervallet av *in vivo*-responser baserat på högkvalitativa RhCE-testmetoddata (0 till 100 % viabilitet), xi) finns kommersiellt tillgängliga, och xii) inte är förknippade med oöverkomliga anskaffnings- och eller bortskaffningskostnader. I situationer där en kemikalie i förteckningen inte finns att tillgå eller inte kan användas av andra giltiga skäl kan en annan kemikalie som uppfyller de ovan beskrivna kriterierna användas, till exempel en av dem som användes i valideringen av VRM. Men sådana avvikelser bör motiveras.

Tabell 1: Förteckning över kvalifikationskemikalier

Kemiskt namn	CAS-nummer	Organisk funktionell grupp ¹	Fysikaliskt tillstånd	VRM1 viabilitet (%) ²	VRM2 viabilitet (%) ³	VRM- prediktion	Reducerar MTT	Färginterf.
<i>In Vivo kategori 1⁴</i>								
Metyltioglykolat	2365-48-2	Karboxylsyraester, tioalkohol	Flytande	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	Ingen prediktion kan göras	J (starkt)	N
Hydroxietylakrylat	818-61-1	Akrylat, alkohol	Flytande	7,5 ± 4,7 ⁵	1,6 ± 1,0	Ingen prediktion kan göras	N	N
2,5-dimetyl-2,5-hexandiol	110-03-2	Alkohol	Fast	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	Ingen prediktion kan göras	N	N
Natriumoxalat	62-76-0	Oxokarboxylsyra	Fast	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	Ingen prediktion kan göras	N	N
<i>In vivo kategori 2A⁴</i>								
2,4,11,13-Tetraazatetradekan-diimidamid, N,N"-bis(4-klorfenyl)-3,12-diimino-, di-D-glukonat (20 %, vattenbaserad) ⁶	18472-51-0	Aromatisk heterocyklisk halid, arylhalid, dihydroxylgrupp, guanidin	Flytande	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	Ingen prediktion kan göras	N	J (svagt)
Natriumbensoat	532-32-1	Aryl, karboxylsyra	Fast	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	Ingen prediktion kan göras	N	N
<i>In Vivo kategori 2B⁴</i>								
Dietyltoluamid	134-62-3	Bensamid	Flytande	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Ingen prediktion kan göras	N	N
2,2-Dimetyl-3-metylenbicyklo [2.2.1] heptan	79-92-5	Alkan, grenad med tertiärt kol, alken, bicykloheptan, karbocykliska ämnen med ringbrygga, cykloalkan	Fast	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Ingen prediktion kan göras	N	N

Kemiskt namn	CAS-nummer	Organisk funktionell grupp ¹	Fysikaliskt tillstånd	VRM1 viabilitet (%) ²	VRM2 viabilitet (%) ³	VRM- prediktion	Reducerar MTT	Färginterf.
<i>In Vivo Ingen klassificering⁴</i>								
1-Etyl-3-metylimidazoliumetylsulfat	342573-75-5	Alkoxi, ammoniumsalt, aryl, imidazol, sulfat	Flytande	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Ingen klassificering	N	N
Dikaprylyleter	629-82-3	Alkoxi, eter	Flytande	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Ingen klassificering	N	N
Piperonylbutoxid	51-03-6	Alkoxi, benzodioxol, bensyl, eter	Flytande	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Ingen klassificering	N	N
Polyetylenglykol (PEG-40) hydrerad ricinolja	61788-85-0	Acyl-grupp (acylal), alkohol, allyl, eter	Viskös	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Ingen klassificering	N	N
1-(4-klorfenyl)-3-(3,4-diklorfenyl)urea	101-20-2	Aromatisk heterocyklisk halid, arylhalid, ureaderivat	Fast	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	Ingen klassificering	N	N
2,2'-Metylen-bis[6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetrametylbutyl)-fenol]	103597-45-1	Alkan grenad med kvartärt kol, fuserat karbocykliskt aromatiskt ämne, fuserade mättade heterocykliska ämnen, prekursorer till kinoida ämnen, tert-butyl	Fast	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	Ingen klassificering	N	N
Kaliumtetrafluorborat	14075-53-7	Oorganiskt salt	Fast	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Ingen klassificering	N	N

Förkortningar: CAS-nummer = nummer i registret som förs av Chemical Abstracts Service, GHS = FN:s globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (1), VRM1 = Validerad referensmetod, EpiOcular™ EIT, VRM2 = Validerad referensmetod, SkinEthic™ HCE EIT, Färginterf. = färginterferens med standardabsorbansmätning av MTT-formazan (optisk densitet, OD).

¹ Organisk funktionell grupp identifierad med hjälp av en samling definierade regler benämnd Organiska Funktionella Grupper (nästlad) i OECD:s verktygslåda för QSAR, version 3.1 (8).

² Baserat på resultat från EpiOcular™ EIT i valideringsstudien av ögonirritation (EIVS) utförd av EURL ECVAM/Cosmetics Europe (8).

³ Baserat på resultat från SkinEthic™ HCE EIT i valideringsstudien (10) (11).

⁴ Baserat på *in vivo*-kaninögonontest (TM B.5/OECD TG 405) (2) (14) och med användning av GHS.

⁵ Baserat på resultat från CEFIC Consortium for *in vitro* Eye Irritation testing strategy (CON4EI) Study.

⁶ Klassificering i kategori 2A eller 2B beror på tolkningen av GHS-kriteriet för att skilja mellan dessa båda kategorier, dvs. 1 av 3 jämfört med 2 av 3 djur med effekter på dag 7, vilket krävs för en klassificering som kategori 2A. *In vivo*-studien omfattade 3 djur. Alla endpoints, förutom hornhinnegrumlingen hos ett djur, återhämtades till noll dag 7 eller

tidigare. Det djur som inte hade återhämtat sig fullständigt dag 7 hade en hornhinnegrumling på 1 (dag 7) som var fullständigt återställd dag 9.

23. Som en del av färdighetstesterna rekommenderas att användarna efter att ha mottagit vävnaderna verifierar deras barriäregenskaper enligt RhCE-modelltillverkarens specifikationer (se punkter 25, 27 och 30). Detta är särskilt viktigt om vävnader transporteras långa sträckor eller om transporten tar lång tid. När ett test framgångsrikt har etablerats och färdigheten i metodanvändningen har påvisats, behöver sådana verifikationer inte göras rutinmässigt. Vid rutinmässig användning av ett test rekommenderas dock att man med jämna mellanrum bedömer barriäregenskaperna.

FÖRFARANDE

24. De tester som för närvarande omfattas av denna testmetod är de vetenskapligt validerade EpiOcular™ EIT och SkinEthic™ HCE EIT (9) (12) (13), omnämnda som Validerad referensmetod (VRM1 respektive VRM2). Standardförfaranden (Standard Operating Procedures, SOP) för RhCE-testmetoder finns tillgängliga och bör användas när testmetoden genomförs och används i laboratoriet (34) (35). Följande punkter och tillägg 2 beskriver RhCE-testernas huvudsakliga delar och förfaranden.

RHCE-TESTMETODENS DELAR

Allmänna betingelser

25. Relevanta celler av humant ursprung bör användas för att rekonstruera den hornhinneliknande, tredimensionella epitelvävnaden, vilken bör bestå av progressivt stratifierade, men inte förhornade celler. Själva RhCE-vävnadsmodellen bereds inuti ilägg försedda med ett poröst, syntetiskt membran genom vilka näringsämnen kan passera in till cellerna. Flera lager av viabla, icke-keratiniserade epitelceller bör finnas i det rekonstruerade hornhinnelika epitelet. För att det ska vara möjligt att genomföra lokal exponering av testkemikalier på ett sätt som liknar den exponering hornhinneepitelet skulle utsättas för *in vivo* bör RhCE-vävnadsmodellens epitelyta ha direkt kontakt med luften. Vidare bör RhCE-vävnadsmodellen bilda en funktionell barriär som är tillräckligt robust för att motstå snabb penetrering av cytotoxiska referensämnen, till exempel Triton X-100 eller natriumdodecylsulfat (SDS). Barriärfunktionen bör demonstreras och kan skattas genom att fastställa antingen den exponeringstid som krävs för att minska vävnadens viabilitet med 50 % (ET₅₀) efter applicering av ett referensämne vid en specificerad, fast koncentration (t.ex. 100 µl med 0,3-volympcentig Triton X-100), eller den koncentration vid vilken ett referensämne minskar vävnadens viabilitet med 50 % (IC₅₀) efter en fast exponeringstid (t.ex. 30 minuters behandling med 50 µl SDS) (se punkt 30). Inneslutningsegenskaperna hos RhCE-vävnadsmodellen ska förhindra att testkemikalie passerar runt kanten på den viabla vävnaden, vilket skulle kunna leda till en bristande modellering av hornhinneexponeringen. De celler av humant ursprung som används för att etablera RhCE-vävnadsmodellen ska vara fria från förorening av

bakterier, virus, mykoplasma och svamp. Vävnadens sterila tillstånd bör kontrolleras av leverantören så att den är fri från förorening av svamp och bakterier.

Funktionella betingelser

Viabilitet

26. MTT-testet används för kvantifiering av vävnadsviabilitet (16). Viabla celler i RhCE-vävnaden reducerar färgämnet MTT till en blå MTT-formazanfällning, vilken sedan extraheras ur vävnaden med isopropanol (eller ett liknande lösningsmedel). Det extraherade MTT-formazanet kan kvantifieras, antingen med en standardabsorbansmätning (optisk densitet, OD) eller ett HPLC-/UPLC-spektrofotometriskt förfarande (36). Extraktionsmedlets OD bör vara tillräcklig låg, det vill säga under 0,1. Användare av RhCE-vävnadsmodellen bör se till att varje sats av RhCE-vävnad som används uppfyller de definierade kriterierna för den negativa kontrollen. Intervallet för acceptabla OD-värden för VRM:ernas negativa kontroller ges i tabell 2. En HPLC-/UPLC-spektrofotometri-användare bör använda OD-intervallen för negativ kontroll angivna i tabell 2 som acceptanskriterier för den negativa kontrollen. Det bör dokumenteras i testrapporten att de vävnader som behandlas med det negativa kontrollämnet är stabila i odling (ger liknande resultat vid viabilitetsmätning) under testets hela exponeringsperiod. Ett liknande förfarande bör följas av vävnadsproducenten som en del av kvalitetskontroll av vävnadssats inför leverans, men i det fallet kan andra acceptanskriterier än de som specificeras i tabell 2 vara tillämpliga. Utvecklaren/leverantören av RhCE-vävnadsmodellen bör fastställa ett acceptansintervall (övre och nedre gräns) för de negativa kontrollernas OD-värden (under testmetodens kvalitetskontrollbetingelser).

Tabell 2: Acceptansintervall för de negativa kontrollernas optiska densitetsvärden (för testanvändare)

Test	Acceptansintervallets nedre gräns	Acceptansintervallets övre gräns
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (för båda protokollen, för flytande resp. fasta ämnen)	> 0,8 ¹	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (för båda protokollen, för flytande resp. fasta ämnen)	> 1,0	≤ 2,5

¹ Denna gräns för godkännande väger in möjligheten av förlängd transport/förvaring (t.ex. > 4 dagar), vilket har visats inte påverka testmetodens prestanda (37).

Barriärfunktion

27. RhCE-vävnaden bör vara tillräckligt tjock och robust för att stå emot snabb penetrering av cytotoxiska referensämnen, bedömt till exempel med ET₅₀ (Triton X-100) eller IC₅₀ (SDS) (tabell 3). Konstruktören/leverantören av RhCE-

vävnadsmodellen bör demonstrera barriärfunktionen hos varje sats av RhCE-vävnad vid leverans av vävnaden till slutanvändaren (se punkt 30).

Morfologi

28. Histologisk undersökning av RhCE-vävnaden bör fastställa human, hornhinne-lik epitelstruktur (omfattande minst 3 lager av viabla epitelceller och en icke-keratiniserad yta). För VRM:erna har lämplig morfologi fastställts av utvecklaren/leverantören och behöver därför inte fastställas på nytt av testmetodanvändaren för varje sats av vävnad som används.

Reproducerbarhet

29. Resultaten för testmetodens positiva och negativa kontroller bör visa reproducerbarhet över tid.

Kvalitetskontroll

30. RhCE-vävnaden bör endast användas om utvecklaren/leverantören har visat att varje sats av RhCE-vävnad motsvarar fastställda leveranskriterier, bland vilka de för viabilitet (punkt 26) och barriärfunktion (se punkt 27) är de mest relevanta. Ett acceptansintervall (övre och nedre gränser) för barriärfunktioner, uppmätta som ET_{50} eller IC_{50} (se punkt 25 och 26) bör etableras av RhCE-vävnadsmodellens utvecklare/leverantör. De acceptansintervall för ET_{50} respektive IC_{50} som utvecklaren/leverantören använder som kvalitetskriterium för leverans av RhCE-vävnaden (använda i VRM:erna) anges i tabell 3. Utvecklaren/leverantören av RhCE-vävnadsmodellen bör tillhandahålla data som demonstrerar överensstämmelse med alla leveranskriterier till testmetodens användare, så att de kan infoga denna information i testrapporten. Endast resultat från vävnader som uppfyller alla dessa leveranskriterier kan godkännas för tillförlitlig prediktion av kemikalier som, i enlighet med GHS/CLP-förordningen, inte kräver klassificering och märkning för ögonirritation eller allvarlig ögonskada.

Tabell 3: Kvalitetskriterium för leverans av en sats

Test	Acceptansintervall ets nedre gräns	Acceptansintervallet s övre gräns
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl 0,3-volympcentig Triton X-100)	$ET_{50} = 12,2$ min	$ET_{50} = 37,5$ min
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (30 minuters behandling med 50 µl SDS)	$IC_{50} = 1$ mg/ml	$IC_{50} = 3,2$ mg/ml

Applicering av testkemikalien och kontrollämnen

31. Minst två vävnadsreplikater ska användas per testkemikalie och kontrollämne i varje testomgång. Två olika behandlingsprotokoll används, ett för testkemikalier i flytande form och ett för testkemikalier i fast form (34) (35). I båda metodernas respektive protokoll bör vävnadsmodellens yta fuktas med kalcium- och magnesiumfri

Dulbeccos fosfatbuffrade saltlösning ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -fri DPBS) innan testkemikalierna appliceras, för att imitera det mänskliga ögats våta tillstånd. Behandlingen av vävnaderna inleds med exponering för testkemikalie(r) och kontrollämnen. I båda behandlingsprotokollen i båda VRM:erna ska tillräcklig mängd testkemikalie eller kontrollämne appliceras för att jämnt täcka epitelytan samtidigt som man undviker infinit dos (se punkt 32 och 33) (tillägg 2).

32. Testkemikalier som kan pipetteras vid 37 °C eller lägre temperaturer (vid behov med hjälp av en positiv displacementpipett) behandlas som vätskor i VRM:erna, i annat fall ska de behandlas som fasta ämnen (se punkt 33). I VRM:erna sprids de flytande testkemikalierna jämnt över vävnadsytan (t.ex. minst 60 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ applicering) (se tillägg 2, [33] [34]). Kapillära effekter (ytspänningseffekter) som kan uppstå på grund av de små volymer som appliceras på ilägget (på vävnadsytan) bör undvikas så långt det är möjligt för att garantera korrekt dosering på vävnaden. Vävnader som behandlas med flytande testkemikalier inkuberas i 30 min. under standardodlingsbetingelser (37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2 , ≥ 95 % relativ luftfuktighet). Vid exponeringstidens slut ska den flytande testkemikalien och kontrollämnena noggrant avlägsnas från vävnadsytan genom grundlig sköljning med $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -fri DPBS vid rumstemperatur. Detta sköljsteg följs efter exponering av en nedsänkning i nytt medium vid rumstemperatur (för att avlägsna eventuella kemikalier som kan ha absorberats in i vävnaden) under en fördefinierad tid, vilken varierar med aktuell VRM. Endast för VMR1 görs en postexponerings-inkubation i nytt medium under standardodlingsbetingelser innan MTT-testet genomförs (se tillägg 2, [34] [35]).
33. Testkemikalier som inte kan pipetteras vid temperaturer upp till 37 °C behandlas i VRM:erna som fasta ämnen. Mängden testkemikalie som appliceras bör vara tillräcklig för att täcka vävnadens hela yta, det vill säga minst 60 mg/cm^2 (tillägg 2). När det är möjligt ska fasta ämnen testas i form av ett fint pulver. Vävnader som behandlas med testkemikalier i fast form inkuberas under en fördefinierad tid (beroende på aktuell VRM) under standardodlingsbetingelser (se tillägg 2 [34] [35]). Vid exponeringstidens slut ska testkemikalien i fast form och kontrollämnena noggrant avlägsnas från vävnadsytan genom grundlig sköljning med $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -fri DPBS vid rumstemperatur. Detta sköljsteg följs efter exponering av en nedsänkning i nytt medium vid rumstemperatur (för att avlägsna eventuella kemikalier som kan ha absorberats in i vävnaden) under en fördefinierad tid, vilken varierar med vald VRM, och en postexponerings-inkubation i nytt medium under standardodlingsbetingelser, innan MTT-testet genomförs (se tillägg 2, [34] [35]).
34. Parallella negativa och positiva kontroller bör inkluderas i varje testomgång för att kontrollera att vävnadens viabilitet (fastställd med negativ kontroll) och känslighet (fastställd med positiv kontroll) håller sig inom de acceptansintervall som har definierats utifrån historiska data. Den parallella negativa kontrollen ger också ett referensvärde (100 % vävnadsviabilitet) för beräkning av relativ viabilitet i den vävnad som behandlats med testkemikalie (% Viabilitet_{test}). Det ämne som

rekommenderas som positivt kontrollämne med VRM:erna är rent metylacetat (CAS-nr 79-20-9, kommersiellt tillgänglig från till exempel Sigma-Aldrich, katalognr 45997, vätska). Rekommenderade ämnen som negativa kontrollämnen i VRM1 och VRM2 är ultrarent H₂O respektive Ca²⁺/Mg²⁺-fri DPBS. Dessa är de kontrollämnen som användes vid valideringsstudierna av VRM:erna och för vilka det finns mest historiska data. Användningen av lämpliga alternativa positiva eller negativa kontrollämnen bör vara vetenskapligt och adekvat motiverade. Negativa och positiva kontroller bör testas enligt det/de protokoll som används för de testkemikalier vilka ingår i testomgången (dvs. för flytande och/eller fasta ämnen). Denna applicering bör följas av behandlingsexponeringen, sköljning, en nedsänkning efter exponering, och i aktuella fall en postexponerings-inkubation, som beskrivits för kontrollomgångar som görs parallellt med flytande testkemikalier (se punkt 32) eller för kontrollomgångar som görs parallellt med testkemikalier i fast form (se punkt 33), innan MTT-testet görs (se punkt 35) (34) (35). En uppsättning negativa och positiva kontroller är tillräcklig för alla testkemikalier i samma fysikaliska tillstånd (flytande eller fast form) som ingår i samma testomgång.

Mätningar av vävnadsviabilitet

35. MTT-testet är en standardiserad kvantitativ metod (16) som bör användas för att mäta vävnadsviabiliteten i denna testmetod. Den kan användas på en tredimensionell vävnadsmodell. MTT-testet utförs omedelbart efter postexponerings-inkubationen. I VRM:erna placeras RhCE-vävnadsprovet i 0,3 ml av 1 mg/ml MTT-lösning under 180 ± 15 min. vid standardodlingsbetingelser. Färgämnet MTT reduceras av de viabla cellerna i RhCE-vävnaden till en blå MTT-formazanfällning. Den utfällda blå MTT-formazanprodukten extraheras sedan från vävnaden med lämplig volym isopropanol (eller liknande lösningsmedel) (34) (35). Extraktion av de vävnader som har testats med flytande testkemikalier bör göras från både ovan- och undersidan av vävnaden, medan extraktion av vävnader som testats med fasta kemikalier eller färgade vätskor bör göras endast från vävnadens undersida (för att minimera eventuell kontamination av isopropanol-extraktionslösning med eventuellt kvarvarande testkemikalie på vävnadens yta). För vävnader som testats med flytande testkemikalier som inte enkelt kan tvättas bort kan extraktionen också göras från enbart undersidan. De parallellt testade negativa och positiva kontrollämnena ska behandlas på samma sätt som den testade kemikalien. Det extraherade MTT-formazanet kan kvantifieras antingen genom standardabsorbansmätning (OD) vid 570 nm med hjälp av ett filterbandpass på högst ± 30 nm eller genom att använda ett HPLC-/UPLC-spektrofotometriskt förfarande (se punkt 42) (11) (36).
36. Optiska egenskaper hos testkemikalien eller dess kemiska verkan på MTT kan störa mätningarna av MTT-formazan och ge felaktiga skattningar av vävnadsviabilitet. Testkemikalier kan störa mätningarna av MTT-formazan genom direkt reduktion av MTT till blå MTT-formazan, och/eller genom färginterferens om testkemikalien absorberar, naturligt eller genom behandlingsprocedurer, inom samma OD-intervall

som MTT-formazan (dvs. runt 570 nm). Förkontroller bör göras inför testerna för att identifiera möjliga direkt MTT-reducerande ämnen och/eller färginterfererande kemikalier och ytterligare kontroller bör användas för att detektera och korrigera möjliga störningar från sådana testkemikalier (se punkterna 37–41). Detta är särskilt viktigt när en viss testkemikalie inte har avlägsnats helt från RhCE-vävnaden genom sköljning, eller när den penetrerar det hornhinneliknande epitelet och därför finns kvar i RhCE-vävnaden när MTT-testet utförs. För testkemikalier som absorberar ljus i samma intervall som MTT-formazan (naturligt eller efter behandling) och som inte är kompatibla med standardabsorbansmätningen (OD) av MTT-formazan på grund av för stor interferens, det vill säga stark absorption vid 570 ± 30 nm, kan ett HPLC-/UPLC-spektrofotometriskt förfarande för att mäta MTT-formazan användas (se punkterna 41 och 42) (11) (36). En detaljerad beskrivning av hur man detekterar och korregerar direkt MTT-reduktion och interferenser av färgämnen finns i VRM:ernas standardförfaranden (34) (35). Illustrerande flödesscheman som ger vägledning i hur man i VRM1 respektive VRM2 identifierar och hanterar direkt MTT-reducerande ämnen och/eller färginterfererande kemikalier finns också i tillägg 3 och 4.

37. För att identifiera möjlig interferens från testkemikalier som absorberar ljus i samma intervall som MTT-formazan (naturligt eller efter behandling) och besluta om behovet av ytterligare kontroller, blandas testkemikalien med vatten och/eller isopropanol och inkuberas en lämplig tid i rumstemperatur (se tillägg 2, [34] [35]). Om testkemikalien, blandad med vatten och/eller isopropanol, absorberar tillräckligt med ljus inom intervallet 570 ± 20 nm för VRM1 (se tillägg 3), eller om en färgad lösning erhålls när testkemikalien blandas med vatten för VRM2 (se tillägg 4), antas testkemikalien störa standardabsorbansmätningen (OD) för MTT-formazan och ytterligare färgkontroller bör göras, alternativt kan ett HPLC-/UPLC-spektrofotometriskt förfarande användas varvid dessa kontroller inte krävs (se punkter 41 och 42 och tillägg 3 och 4) (34) (35). När standardabsorbansmätningen (OD) utförs bör varje interfererande testkemikalie appliceras på minst två viabla vävnadsreplikater, vilka går igenom hela testförfarandet men under MTT-inkubationssteget inkuberas med medium istället för MTT-lösning för att ge en icke-specifik färgkontroll för levande vävnader (NSC_{living}) (34) (35). Den icke-specifika färgkontrollen NSC_{living} behöver utföras parallellt med testerna av den färgade testkemikalien, och i händelse av flera tester ska en oberoende NSC_{living}-kontroll utföras vid varje genomfört test (i varje testomgång) på grund av den inneboende biologiska variationen i levande vävnader. Faktisk vävnadsviabilitet beräknas som följer: den procentuella vävnadsviabilitet som erhålls med levande vävnad som har exponerats för den interfererande testkemikalien och som har inkuberats med MTT-lösning (% Viabilitet_{test}) minus den procentuella icke-specifika färg som erhålls med levande vävnad, vilken har exponerats för den interfererande kemikalien och som har inkuberats med medium utan MTT, parallellt med testet som korrigeras (% NSC_{living}) det vill säga Faktisk vävnadsviabilitet = [% Viabilitet_{test}] – [% NSC_{living}].

38. För att identifiera ämnen som direkt reducerar MTT bör varje testkemikalie blandas med nyblandad MTT-lösning. En lämplig mängd testkemikalie tillsätts till en MTT-lösning och blandningen inkuberas i ungefär 3 timmar under standardodlingsbetingelser (se tillägg 3 och 4) (34) (35). Om MTT-blandningen som innehåller testkemikalien (eller suspensionen, för olösliga testkemikalier) blir blå/lila, antas testkemikalien direkt reducera MTT och vidare funktionskontroller av icke-viabila RhCE-vävnader bör utföras, oberoende av standardabsorbansmätningen (OD) eller ett HPLC-/UPLC-spektrofotometriskt förfarande. Denna ytterligare funktionella kontroll använder sig av avdödad vävnad som endast har metabolisk restaktivitet men absorberar och behåller testkemikalien på ett sätt som liknar levande vävnader. Avdödad vävnad bereds i VRM1 genom exponering för låg temperatur ("frysadödad"). Avdödad vävnad bereds i VRM2 genom förlängd inkubation (t.ex. minst 24 ± 1 timmar) i vatten följd av förvaring vid låg temperatur ("vattendödad"). Varje testkemikalie som reducerar MTT appliceras på minst två avdödade vävnadsreplikater, vilka genomgår hela testförfarandet för att ge en icke-specifik MTT-reduktionskontroll (NSMTT) (34) (35). En enda NSMTT-kontroll per testkemikalie räcker, oavsett antalet oberoende tester/testomgångar som genomförs. Faktisk vävnadsviabilitet beräknas som följer: den procentuella vävnadsviabilitet som erhålls med levande vävnad som exponerats för den MTT-reducerande kemikalien (% Viabilitet_{test}) minus den procentuella icke-specifika MTT-reduktion som erhålls med den avdödade vävnaden, vilken exponerats för samma MTT-reducerande ämne, beräknad i förhållande till den negativa kontroll som har löpt parallellt med det test som korrigeras (% NSMTT) det vill säga Faktisk vävnadsviabilitet = [% Viabilitet_{test}] – [% NSMTT].
39. Testkemikalier som konstateras både ge färginterferens (se punkt 37) och direkt reducera MTT (se punkt 38) kommer dessutom att kräva en tredje uppsättning kontroller när man utför standardabsorbansmätningen (OD), utöver de NSMTT- och NSC_{living}-kontroller som beskrivits i föregående punkter. Detta är oftast fallet med mörkt färgade testkemikalier som absorberar ljus i intervallet 570 ± 30 nm (t.ex. blå, lila, svart) eftersom deras färg försvårar skattningen av deras förmåga att direkt reducera MTT, som beskrivits i punkt 38. Detta tvingar fram användningen av NSMTT-kontroller, som standard, tillsammans med NSC_{living}-kontroller. Testkemikalier för vilka både NSMTT- och NSC_{living}-kontroller utförs kan absorberas och stanna kvar i både levande och avdödad vävnad. Därför kan NSMTT-kontrollen korrigera, inte bara för testkemikaliens eventuella, direkta MTT-reduktion, utan också för färginterferens som uppstår vid absorption och retention av testkemikalien i avdödad vävnad. Detta skulle kunna leda till dubbel korrigering för färginterferens eftersom NSC_{living}-kontrollen redan korregerar för färginterferens som uppstår vid absorption och retention av testkemikalien i levande vävnad. För att undvika möjlig dubbel korrigering för färginterferens behöver en tredje kontroll för icke-specifik färg i avdödad vävnad (NSC_{killed}) genomföras (se tillägg 3 och 4) (34) (35). I denna ytterligare kontroll behöver testkemikalien appliceras på minst två avdödade

vävnadsreplikat, vilka genomgår hela testförfarandet men som inkuberas med medium istället för MTT-lösning under steget med MTT-inkubation. En enda NSC_{killed}-kontroll per testkemikalie räcker, oavsett antalet oberoende tester/testomgångar som genomförs, men bör genomföras parallellt med NSMTT-kontrollen och med samma sats av vävnader. Faktisk vävnadsviabilitet beräknas som följer: den procentuella vävnadsviabilitet som erhålls med levande vävnad som exponerats för testkemikalien (% Viabilitet_{test}) minus % NSMTT minus % NSC_{living} plus den procentuella icke-specifika färg som erhålls med den avdödade vävnaden vilken exponerats för den interfererande testkemikalien och inkuberats med medium utan MTT, beräknad i förhållande till den negativa kontroll som har löpt parallellt med det test som korrigeras (%NSC_{killed}), det vill säga Faktisk vävnadsviabilitet = [% Viabilitet_{test}] – [% NSMTT] – [% NSC_{living}] + [% NSC_{killed}].

40. Det är viktigt att notera att icke-specifik MTT-reduktion och icke-specifik färginterferens (i samband med standardabsorbansmätningar) kan öka vävnadsextraktets OD över spektrofotometerens linjära intervall och att icke-specifik MTT-reduktion (i samband med HPLC-/UPLC-spektrofotometriska mätningar) också kan öka vävnadsextraktets topparea för MTT-formazan över spektrofotometerens linjära intervall. På grund av detta är det viktigt att varje laboratorium fastställer det linjära intervallet för OD/topparea hos sin spektrofotometer med till exempel MTT-formazan (CAS-nr 57360-69-7), kommersiellt tillgänglig från till exempel Sigma-Aldrich (katalognr M2003), innan testning av testkemikalier påbörjas i tillsynssyfte.
41. Standardabsorbansmätning (OD) med hjälp av en spektrofotometer är lämplig vid bedömning av direkta MTT-reducerare och färginterfererande testkemikalier när den aktuella störningen av MTT-formazanmätningen inte är för kraftig (dvs. OD-värdena för vävnadsextrakten som erhålls med testkemikalien, utan korrektion för direkt MTT-reduktion och/eller färginterferens, ligger inom spektrofotometerens linjaritetsintervall). Men resultat där en testkemikalie ger % NSMTT och/eller % NSC_{living} ≥ 60 % (VRM1, och VRM2-protokoll för flytande ämnen) eller 50 % (VRM2-protokoll för fasta ämnen) av den negativa kontrollen bör hanteras med försiktighet eftersom dessa är de etablerade brytvärden som används i VRM:erna för att skilja klassificerade från icke-klassificerade kemikalier (se punkt 44). Men standardabsorbans (OD) kan inte mätas när interferensen med MTT-formazanmätningen är för kraftig (dvs. det leder till att okorrigerade OD-värden för testvävnadsextrakten faller utanför spektrofotometerens linjära intervall). Färgade testkemikalier, eller testkemikalier som blir färgade vid kontakt med vatten eller isopropanol, som interfererar för starkt med standardabsorbansmätningen (OD) för MTT-formazan kan ändå utvärderas med HPLC-/UPLC-spektrofotometri (se tillägg 3 och 4). Anledningen till det är att HPLC-/UPLC-systemet gör det möjligt att skilja MTT-formazanet från testkemikalien innan den kvantifieras (36). Därför krävs inga NSC_{living}- eller NSC_{killed}-kontroller när man använder HPLC-/UPLC-spektrofotometri, oberoende av vilken kemikalie som testas. Trots detta bör NSMTT-kontroller

användas, om testkemikalien misstänks direkt reducera MTT (enligt förfarande beskrivet i punkt 38). Dessutom bör NSMTT-kontroller också användas tillsammans med testkemikalier som har en färg (inneboende eller som uppkommer i vattenlösning) som hämmar bedömningen av deras kapacitet att direkt reducera MTT så som beskrivits i punkt 38. När man använder HPLC-/UPLC-spektrofotometri för att mäta MTT-formazan, beräknas procentuell vävnadsviabilitet som de procent MTT-formazantopparea som erhålls med levande vävnad exponerad för testkemikalien, i förhållande till den MTT-formazantopparea som erhålls med den parallella negativa kontrollen. För testkemikalier som direkt kan reducera MTT beräknas faktisk vävnadsviabilitet som följer: $\% \text{viabilitet}_{\text{test}} - \% \text{NSMTT}$, som beskrivs i den sista meningen under punkt 38. Slutligen bör man notera att direkta MTT-reducerare eller direkta MTT-reducerare som också är färginterfererande, vilka stannar kvar i vävnaderna efter behandling och reducerar MTT så kraftigt att de leder till OD-värden (vid standard OD-mätning) eller toppareor (vid UPLC-/HPLC-spektrofotometri) hos de testade vävnadsextrakten som faller utanför spektrofotometerns linjära intervall inte kan bedömas med RhCE-testmetoder, även om de förväntas förekomma väldigt sällan.

42. HPLC-/UPLC-spektrofotometri kan användas för alla sorters testkemikalier (färgade, icke-färgade, MTT-reducerare och icke-MTT-reducerare) för MTT-formazanmätning (11) (36). På grund av mångfalden av spektrofotometriska HPLC-/UPLC-system är det inte möjligt för varje användare att upprätta exakt samma systemförhållanden. Innan det spektrofotometriska HPLC-/UPLC-systemet används för att kvantifiera MTT-formazan från vävnadsextrakt bör dess kvalifikationer påvisas genom att det visas motsvara acceptanskriterierna för en uppsättning standardparametrar för kvalificering, baserade på de parametrar som beskrivs i branschvägledningen från amerikanska Food and Drug Administration för validering av bioanalytiska metoder (36) (38). Dessa nyckelparametrar och deras acceptanskriterier visas i tillägg 5. När de acceptanskriterier som definieras i tillägg 5 har uppfyllts anses det spektrofotometriska HPLC-/UPLC-systemet vara kvalificerat och färdigt att mäta MTT-formazan under de experimentella förhållanden som beskrivs i denna testmetod.

Acceptanskriterier

43. För varje testomgång där man använder satser av RhCE-vävnad som uppfyllt kvalitetskraven (se punkt 30), ska de vävnadsprover som behandlas med negativt kontrollämne uppvisa OD som motsvarar den kvalitet vävnaderna hade efter frakt, mottagningsrutiner och alla protokollrelaterade procedurer och bör inte ligga utanför de historiskt fastställda gränserna som beskrivs i tabell 2 (se punkt 26). På samma sätt ska vävnader som behandlas med positivt kontrollämne, det vill säga metylacetat, uppvisa genomsnittlig vävnadsviabilitet $< 50 \%$ i förhållande till den negativa kontrollen i VRM1, med protokollet för antingen flytande eller fasta ämnen, och $\leq 30 \%$ (protokollet för flytande ämnen) eller $\leq 20 \%$ (protokollet för fasta ämnen) i förhållande till den negativa kontrollen i VRM2 så att de återspeglar vävnadernas

förmåga att svara på en irriterande testkemikalie under testmetodens förhållanden (34) (35). Variationen mellan vävnadsreplikater med testkemikalier och kontrollämnen bör falla inom accepterade gränser (dvs. skillnaden i viabilitet mellan två vävnadsreplikater bör vara mindre än 20 %, eller standardavvikelsen [SD] mellan tre vävnadsreplikater bör inte överstiga 18 %). Om antingen den negativa eller positiva kontrollen som ingår i en testomgång faller utanför accepterat intervall anses omgången ”icke-kvalificerad” och bör upprepas. Om variationen mellan vävnadsreplikater av en testkemikalie faller utanför det accepterade intervallet anses testet ”icke-kvalificerat” och testkemikalien bör testas på nytt.

Tolkning av resultaten och prediktionsmodell

44. De OD-värden/toppareor som erhålls med extrakten från vävnadsreplikaten för varje testkemikalie ska användas för att beräkna genomsnittlig procentuell vävnadsviabilitet (medelvärde mellan vävnadsreplikaten) normaliserad mot negativ kontroll, vilken sätts som 100 %. Brytvärdet för procentuell vävnadsviabilitet som identifierar testkemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada (GHS och CLP Ingen klassificering) ges i tabell 4. Resultat ska då tolkas som följer:

- Testkemikalien fastställs till att inte kräva klassificering och märkning enligt GHS och CLP-förordningen (Ingen klassificering) om medelvärdet för procentuell vävnadsviabilitet efter exponering och postexponerings-inkubation är mer än (>) det fastställda brytvärdet för procentuell vävnadsviabilitet, enligt tabell 4. I detta fall krävs ingen ytterligare testning med andra testmetoder.
- Om medelvärdet för procentuell vävnadsviabilitet efter exponering och postexponerings-inkubation är lika med eller mindre än ($\leq$) det fastställda brytvärdet för procentuell vävnadsviabilitet, kan ingen prediktion göras, som visas i tabell 4. I det här fallet kommer ytterligare testning med andra testmetoder att krävas eftersom RhCE-testmetoder visar ett visst antal falskt positiva resultat (se punkterna 14–15) och inte kan särskilja mellan GHS- och CLP-kategorierna 1 och 2 i (se punkt 17).

Tabell 4: Prediktionsmodeller för GHS- och CLP-klassificering

VRM	Ingen klassificering	Ingen prediktion kan göras
VRM1 – EpiOcular™ EIT (för båda protokollen)	Genomsnittlig vävnadsviabilitet > 60 %	Genomsnittlig vävnadsviabilitet ≤ 60 %
VRM2 – SkinEthic™ HCE EIT (för protokollet för flytande ämnen)	Genomsnittlig vävnadsviabilitet > 60 %	Genomsnittlig vävnadsviabilitet ≤ 60 %
VRM2 – SkinEthic™ HCE EIT (för protokollet för fasta ämnen)	Genomsnittlig vävnadsviabilitet > 50 %	Genomsnittlig vävnadsviabilitet ≤ 50 %

45.

46. Ett enskilt test med minst två vävnadsreplikat bör vara tillräckligt för en testkemikalie, förutsatt att resultatet är otvetydigt. Men vid fall med gränsresultat, som icke-konkordanta replikatmätningar och/eller genomsnittlig procentuell vävnadsviabilitet lika med $60 \pm 5 \%$ (VRM1, och VRM2 med protokoll för flytande ämnen) eller $50 \pm 5 \%$ (VRM2 med protokoll för fasta ämnen), bör man överväga ett andra test, och ett tredje om resultaten mellan de två första testerna är diskordanta.
47. Olika brytvärden för procentuell vävnadsviabilitet vilka skiljer klassificerade från icke-klassificerade testkemikalier kan övervägas för särskilda sorters blandningar, när så är lämpligt och motiverat, för att öka testmetodens sammantagna prestanda för den sortens blandningar (se punkt 14). Referenskemikalier kan vara värdefulla vid utvärdering av potentialen för allvarlig ögonskada/ögonirritation hos okända testkemikalier eller okänd produktklass, eller för att utvärdera den relativa okulära toxicitetspotentialen hos en klassificerad kemikalie inom ett specifikt intervall av positiva responser.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

48. Data från enskilda vävnadsreplikat i en testomgång (t.ex. OD-värden/MTT-formazantoppareor och beräknade procentuella vävnadsviabilitetsdata för testkemikalien och kontrollerna, och den slutliga prediktionen från RhCE-testmetoden) bör rapporteras i tabellform för varje testkemikalie, inklusive data från upprepade tester, när det är lämpligt. Dessutom bör genomsnittlig procentuell vävnadsviabilitet och skillnad i viabilitet mellan två vävnadsreplikat (om $n = 2$ vävnadsreplikat) eller SD (om $n > 3$ vävnadsreplikat) för varje enskild testkemikalie och kontroll rapporteras. Eventuella uppmärksammade interferenser av en testkemikalie med mätningen av MTT-formazan genom direkt MTT-reduktion och/eller färginterferens bör rapporteras för varje testad kemikalie.

Testrapport

49. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie

Monokomponentämne

- Kemisk beteckning, såsom IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel och/eller andra beteckningar.
- Fysikaliskt tillstånd, volatilitet, pH, LogP, molekylvikt, kemisk klass och andra relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper med relevans för studiens genomförande, i den utsträckning de finns tillgängliga.

- Renhet, kemisk identitet för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.
- Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).
- Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

Multikomponentämne, UVCB och blandning

- Karakteriseras så långt det är möjligt genom exempelvis kemisk identitet (se ovan), renhet, kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper (se ovan) hos beståndsdelarna, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Fysikaliskt tillstånd och andra relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper med relevans för studiens genomförande, i den utsträckning de finns tillgängliga.
- Renhet, kemisk identitet för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.
- Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).
- Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

Positiva och negativa kontrollämnena

- Kemisk beteckning, såsom IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel och/eller andra beteckningar.
- Fysikaliskt tillstånd, volatilitet, molekylvikt, kemisk klass och andra relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper med relevans för studiens genomförande, i den utsträckning de finns tillgängliga.
- Renhet, kemisk identitet för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.
- Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).
- Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Motivering till varför annan negativ kontroll än ultrarent H₂O eller Ca²⁺/Mg²⁺-fri DPBS använts, om tillämpligt.
- Motivering till varför annan positiv kontroll än ren metylacetat använts, om tillämpligt.
- Hänvisning till historiska positiva och negativa kontrollresultat som visar lämpliga acceptanskriterier för testomgångarna.

Uppgifter om sponsor och testanläggning

- Namn och adress för sponsor, testanläggning och försöksledare.

Uppgift om vilken RhCE-vävnadsmodell och vilket protokoll som använts (med motivering till valen, om tillämpligt)

Testmetodens betingelser

- Använd RhCE-vävnadsmodell, inklusive satsnummer.
- Våglängd och filterbandpass (om tillämpligt) som använts för kvantifiering av MTT-formazan, och linjärt intervall hos mätanordningen (t.ex. spektrofotometer).
- Beskrivning av den metod som använts för att kvantifiera MTT-formazan.
- Beskrivning av det spektrofotometriska HPLC-/UPLC-systemet, om tillämpligt.
- Fullständig stödande information för den specifika RhCE-vävnadsmodell som använts, inklusive dess prestanda. Denna ska omfatta men inte vara begränsad till följande:
 - i) Kvalitetskontroll av viabilitet (leverantör).
 - ii) Viabilitet under testmetodens betingelser (användare).
 - iii) Kvalitetskontroll av barriärfunktion.
 - iv) Morfologi, om tillgänglig.
 - v) Reproducerbarhet och prediktiv kapacitet.
 - vi) Andra kvalitetskontroller (QC) av RhCE-vävnadsmodellen, om tillgängliga.
- Hänvisning till historiska uppgifter om RhCE-vävnadsmodellen. Denna ska omfatta men inte vara begränsad till följande: Uppgifter om huruvida kvalitetskontrolldata är godtagbara med avseende på historiska uppgifter om respektive sats.
- Uppgift om att testanläggningen har uppvisat färdighet i användningen av testmetoden inför rutinmässig användning genom ett test av kvalifikationskemikalier.

Acceptanskriterier för tester och testomgångar

- Medelvärden och acceptansintervall för positiva och negativa kontroller baserade på historiska uppgifter.
- Acceptabel variation mellan vävnadsreplikat för positiva och negativa kontroller.
- Acceptabel variation mellan vävnadsreplikat för testkemikalien.

Testförfarande

- Detaljerade uppgifter om testförfarandet.
- Doser av använda testkemikalier och kontrollämnen.

- Exponeringens varaktighet och temperatur, varaktighet på nedsänkning efter exponering och postexponerings-inkubation (om tillämpligt).
- Beskrivning av eventuella modifieringar av testförfarandet.
- Uppgifter om kontroller som använts för direkt MTT-reduktion och/eller färgade testkemikalier, om tillämpligt.
- Antal vävnadsreplikater som används per testkemikalie och kontroller (positiv kontroll, negativ kontroll, NSMTT, NSC_{living} och NSC_{killed}, om tillämpligt).

Resultat

- Tabell med data från enskilda testkemikalier och kontrollämnen för varje testomgång (inklusive upprepade experiment om tillämpligt) och mätningar för varje replikat, inklusive OD-värde eller MTT-formazantopparea, procentuell vävnadsviabilitet, genomsnittlig procentuell vävnadsviabilitet, skillnad mellan vävnadsreplikater eller SD och slutlig prediktion.
- Om tillämpligt, resultat från kontroller som använts för direkt MTT-reduktion och/eller färgade testkemikalier, inklusive OD-värde eller topparea för MTT-formazan, % NSMTT, % NSC_{living}, % NSC_{killed}, skillnad mellan vävnadsreplikater eller SD, slutlig korrekt procentuell vävnadsviabilitet och slutlig prediktion.
- Resultat som erhållits med testkemikalien (testkemikalierna) och kontrollämnena i förhållande till definierade acceptanskriterier för testomgången och testet som helhet.
- Beskrivning av övriga observerade effekter, till exempel färgning av vävnaderna av en färgad testkemikalie.

Diskussion kring resultaten

Slutsats

LITTERATUR

- (1) FN (2015). FN:s globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, sjätte reviderade upplagan, New York och Genève: FN. Finns på http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (2) Kapitel B.5 i denna bilaga, Akut ögonirritation/ögonkorrosion.
- (3) Kapitel B.47 i denna bilaga, Testmetoden BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability) för identifiering av i) kemikalier som orsakar allvarlig ögonskada och ii) kemikalier för vilka det inte krävs klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada.
- (4) Kapitel B.48 i denna bilaga, Testmetoden ICE (Isolated Chicken Eye test) för identifiering av i) kemikalier som orsakar allvarlig ögonskada och ii) kemikalier för vilka det inte krävs klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada.
- (5) Kapitel B.61 i denna bilaga, Testmetoden fluoresceinläckage för identifiering av ämnen som är frätande och kraftigt irriterande för ögonen.
- (6) Kapitel B.68 i denna bilaga, *In vitro*-testmetoden korttidsexponering (Short Time Exposure Test) för identifiering av i) kemikalier som orsakar allvarlig ögonskada och ii) kemikalier för vilka det inte krävs klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada.
- (7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special issue 2010, 261-266.
- (8) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Finns på <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280>.
- (9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Finns på <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702>.

- (10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D., Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.
- (11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.
- (12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Finns på <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704>.
- (13) EC EURL ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Manuscript in preparation).
- (14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. *Journal of Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377–390.
- (15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.
- (16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (17) OECD (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference

Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.

- (18) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.
- (19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.
- (20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. I: Salem, H., Katz, S.A. (red.), *Alternative toxicological methods*, CRC Press, s. 147-159.
- (21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.
- (22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476-1488.
- (23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.
- (24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

- (25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.
- (26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113–126.
- (27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye irritation. I: *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N. och Maibach H.I. (red.), fjärde upplagan, s. 749–815. Washington, DC, Förenta staterna: Hemisphere Publishing Corporation.
- (28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. I: Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D. (red.), sjunde upplagan s. 665-697. Withby, ON, Kanada: McGraw-Hill Ryerson.
- (29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922-936.
- (30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.
- (31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115-130.
- (32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610-2625.
- (33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41-54.
- (34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Finns på

[<https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>].

- (35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SKINETHIC™ HCE Eye Irritation Test (EITL för flytande ämnen, EITS för fasta ämnen) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Finns på <https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>.
- (36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.
- (37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.
- (38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Finns på <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.
- (39) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.

Tillägg 1

DEFINITIONER

Exakthet: Ett mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Det är en relevansaspekt och ett mått på testmetodens prestanda. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (18).

Referenskemikalie: En kemikalie som används som en standard för jämförelse med en testkemikalie. En referenskemikalie ska ha följande egenskaper: i) konsekvent och pålitligt medel för dess identifiering och karakterisering, ii) strukturell, funktionell och/eller kemisk likhet eller produktklass-likhet med den/de kemikalie(r) som testas, iii) kända fysikalisk-kemiska egenskaper, iv) stödjande data om kända effekter, och v) känd styrka inom det önskade responsområdet.

Nedifrån och upp-strategi: Stegvis metod som tillämpas på en testkemikalie som inte tros kräva klassificering och märkning för ögonirritation eller allvarlig ögonskada; det första steget är att skilja kemikalier som inte behöver klassificeras och märkas (negativt utfall) från andra kemikalier (positivt utfall).

Kemikalie: Ett ämne eller en blandning.

Konkordans: Överensstämmelse, se ”Exakthet”.

Hornhinna (kornea): Den transparenta delen av ögonglobens framsida, som täcker iris och pupillen och släpper in ljus i ögat.

CV: Variationskoefficient.

Dev: Avvikelse (deviation).

EIT: Ögonirritationstest (Eye Irritation Test).

EURL ECVAM: EU:s referenslaboratorium för alternativ till djurförsök (European Union reference laboratory for alternatives to animal testing).

Ögonirritation: Förändringar som uppstår i ögat efter applicering av en testkemikalie på ögats främre yta och som är fullt reversibla inom 21 dagar från appliceringen. Utbytbart mot ”Reversibla effekter på ögat” och ”GHS-/CLP-kategori 2”.

ET₅₀: Den exponeringstid som krävs för att minska vävnadsviabiliteten med 50 % vid applicering av en referenskemikalie med en fastställd, fast koncentration.

Falskt negativt värde: Den andel av alla positiva ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som negativa. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

Falskt positivt värde: Den andel av alla negativa ämnen som av en testmetod felaktigt

identifieras som positiva. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

Fara: Inneboende egenskap hos ett ämne eller en situation som har potential att orsaka skadliga effekter när en organism, ett system eller en (del-) population exponeras för ämnet.

HCE: SkinEthic™ Human Corneal Epithelium, humant hornhinneepitel.

HPLC: Högupplösande vätskekromatografi.

IC₅₀: Koncentration vid vilken en referenskemikalie minskar vävnadens viabilitet med 50 % efter en fast exponeringstid (t.ex. 30 minuters behandling med SDS).

Infinit dos: En mängd testkemikalie som appliceras på RhCE-vävnaden och som överstiger den mängd som krävs för att helt täcka epitelets yta med ett jämnt lager.

Irreversibla effekter på ögat: Se ”Allvarlig ögonskada”.

LLOQ: Nedre kvantifieringsgräns (Lower Limit of Quantification).

LogP: Logaritmen för fördelningskoefficienten för oktanol-vatten.

Blandning: En blandning eller en lösning som består av två eller flera ämnen.

Monokomponentämne: Ett ämne, definierat av sin kvantitativa sammansättning, där en huvudsaklig beståndsdel utgör minst 80 viktprocent.

Multikomponentämne: Ett ämne, definierat av sin kvantitativa sammansättning, där fler än en huvudsaklig beståndsdel förekommer i en koncentration på ≥ 10 viktprocent och < 80 viktprocent. Ett multikomponentämne är resultatet av en tillverkningsprocess. Skillnaden mellan blandningar och multikomponentämnen är att en blandning erhålls genom att två eller flera ämnen blandas utan någon kemisk reaktion. Ett multikomponentämne är resultatet av en kemisk reaktion.

MTT: 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid, tiazolylblåtetrazoliumbromid.

Negativ kontroll: Ett prov som innehåller ett testsystems alla komponenter och som behandlas med ett ämne känt för att inte inducera positiv respons från testsystemet. Detta prov hanteras tillsammans med testkemikaliebehandlade prover och andra kontrollprover och används för att fastställa 100 % vävnadsviabilitet.

Icke-klassificerad: Kemikalier som inte är klassificerade som ögonirriterande (GHS/CLP-förordningen kategori 2, GHS kategori 2A eller 2B) eller som orsakande allvarlig ögonskada (GHS/CLP-kategori 1). Utbytbar mot ”GHS-/CLP-kategori Ingen klassificering”.

NSC_{killed}: Icke-specifik färg i avdödade vävnader.

NSC_{living}: Icke-specifik färg i levande vävnader.

NSMTT: Icke-specifik MTT-reduktion (Non-Specific MTT).

OD: Optisk densitet

Prestandastandarder: Standarder, baserade på en validerad testmetod som ansetts vetenskapligt giltig, vilka utgör grunden för utvärdering av jämförbarheten hos en föreslagen testmetod som är mekanistiskt och funktionellt likartad. Följande ingår: i) testmetodens grundläggande komponenter, ii) en minimiförteckning med referenskemikalier som valts ut från de kemikalier som använts för att påvisa att den validerade testmetoden fungerar tillfredsställande och iii) de jämförbara nivåer av exakthet och tillförlitlighet, på grundval av vad som erhållits för den validerade testmetoden, som man bör kunna påvisa för den föreslagna testmetoden när den utvärderas med användning av minimiförteckningen med referenskemikalier (18).

Positiv kontroll: Ett prov som innehåller ett testsystems alla komponenter och som behandlas med ett ämne känt för att inducera positiv respons från testsystemet. Detta prov hanteras tillsammans med testkemikaliebehandlade prover och andra kontrollprover. För att säkerställa att variationer i den positiva kontrollens respons över tid kan bedömas, bör den positiva responsen inte vara alltför kraftfull.

Relevans: Beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida det är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl man genom testet korrekt kan mäta och prediktera den biologiska effekten det gäller. Relevans omfattar också överväganden om en testmetods exakthet (konkordans) (18).

Tillförlitlighet: Mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tid, när den utförs med användning av samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier och repeterbarheten inom laboratorier (18).

Ersättningstest: Ett test utformat för att ersätta ett test som används rutinmässigt och som är godkänt för faroidentifiering och/eller riskbedömning och som har konstaterats ge motsvarande eller bättre skydd av människors eller djurs hälsa eller miljön, enligt det som är tillämpligt, jämfört med det godkända testet, för alla tänkbara testningssituationer och kemikalier (18).

Reproducerbarhet: Överensstämmelse mellan resultat som erhållits från upprepade tester av samma testkemikalie med användning av samma testprotokoll (se ”Tillförlitlighet”) (18).

Reversibla effekter på ögat: Se ”Ögonirritation”.

RhCE: Rekonstruerat humant hornhinnelik epitel (Reconstructed human Cornea-like Epithelium).

Testomgång: En testomgång utgörs av att en eller flera testkemikalier testas parallellt med en negativ kontroll och en positiv kontroll.

SD: Standardavvikelse (Standard Deviation).

Känslighet: Den andel av alla positiva/aktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testet. Det är ett mått på exaktheten hos en kategoriserande testmetod och är en viktig faktor vid bedömningen av en testmetods relevans (18).

Allvarlig ögonskada: Vävnadsskada i ögat eller kraftig synnedsättning som uppstår efter applicering av en testkemikalie på ögats främre yta och som inte är fullt reversibel inom 21 dagar från appliceringen. Utbytbar mot ”Irreversibla effekter på ögat” och ”GHS/CLP-kategori 1”.

Standardförfaranden: Formella, skriftliga förfaranden som i detalj beskriver hur särskilda rutiner och testspecifika laboratoriearbeten ska utföras (Standard Operating Procedure, SOP). De är obligatoriska enligt GLP (Good Laboratory Practice).

Specificitet: Den andel av alla negativa/inaktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testet. Det är ett mått på exaktheten hos en kategoriserande testmetod och är en viktig faktor vid bedömningen av en testmetods relevans (18).

Ämne: Ett kemiskt grundämne och föreningar av detta grundämne i naturlig eller tillverkad form, inklusive eventuella tillsatser som är nödvändiga för att bevara ämnets stabilitet och sådana föroreningar som härrör från tillverkningsprocessen, men exklusive eventuella lösningsmedel som kan avskiljas utan att det påverkar ämnets stabilitet eller ändrar dess sammansättning.

Test: Parallella tester av en enskild testkemikalie på minst två vävnadsreplikat enligt angivelser i relevant standardförfarande.

Vävnadsviabilitet: Parameter som mäter en cellpopulations totala aktivitet i en rekonstruerad vävnad som dess förmåga att reducera MTT, vilket, beroende på testets utformning och vilken endpoint som mäts, korrelerar till det totala antalet celler och/eller till cellernas viabilitet.

Uppifrån och ned-strategi: Stegvis metod som tillämpas på kemikalier som misstänks orsaka allvarlig ögonskada; det första steget är att skilja kemikalier som inducerar allvarlig ögonskada (positivt utfall) från andra kemikalier (negativt utfall).

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

Stegvis testningsstrategi: En sekventiell teststrategi som använder sig av olika testmetoder efter varandra. All befintlig information om en testkemikalie granskas vid varje steg, med användning av förfarandet med sammanvägd bedömning (weight of evidence) för att avgöra om det finns tillräckligt med information till hands för att besluta om faroklassificering innan man går vidare till nästa steg i strategin. Om testkemikaliens potential/styrka att framkalla skada kan fastställas utifrån befintlig information vid ett givet steg behövs ingen ytterligare testning (18).

ULOQ: Övre kvantifieringsgräns (Upper Limit of Quantification).

FN:s globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier

(GHS): Ett system för att klassificera kemikalier (ämnen och blandningar) enligt standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker och informera om resultaten genom till exempel piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad i syfte att informera om ämnens skadliga effekter för att skydda personer (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) och miljön (1).

GHS-/CLP-kategori 1: Se ”Allvarlig ögonskada”.

GHS-/CLP-kategori 2: Se ”Ögonirritation”.

GHS-/CLP-kategori Ingen klassificering: Kemikalier som inte uppfyller kraven för att klassificeras enligt GHS-/CLP-kategori 1 eller 2 (eller GHS-kategori 2A eller 2B). Utbytbar mot Icke-klassificerad.

UPLC: Ultra-högupplösande vätskekromatografi.

UVCB-ämnen: Ämnen med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter och biologiskt material.

Giltig testmetod: En testmetod som anses vara tillräckligt relevant och tillförlitlig för ett särskilt ändamål och är grundad på vetenskapligt sounda principer. En testmetod är aldrig giltig i absolut bemärkelse, utan endast i förhållande till ett fastställt ändamål (18).

Validerad testmetod: En testmetod för vilken valideringsstudier har genomförts för att fastställa relevans (inklusive exakthet) och tillförlitlighet för ett specifikt ändamål. Det är viktigt att notera att en validerad testmetod kanske inte är tillräckligt exakt och tillförlitlig när det gäller ett visst föreslaget ändamål (18).

VRM: Validerad referensmetod.

VRM1: EpiOcular™ EIT anges som Validerad referensmetod 1.

VRM2: SkinEthic™ HCE EIT anges som Validerad referensmetod 2.

Sammanvägd bedömning: Ett förfarande där man bedömer styrkor och svagheter hos flera uppgifter för att nå fram till och motivera en slutsats huruvida ett testämne kan vara skadligt.

Tillägg 2

HUVUDSAKLIGA DELAR I DE RHCE-TESTER SOM HAR VALIDERATS FÖR IDENTIFIERING AV KEMIKALIER SOM INTE KRÄVER KLASSIFICERING ELLER MÄRKNING FÖR ÖGONIRRITATION ELLER ALLVARLIG ÖGONSKADA

Testdelar	EpiOcular™ EIT (VRM1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM2)	
Protokoll	Vätskor (pipetterbara vid $37 \pm 1^\circ\text{C}$ eller lägre temperaturer under 15 min.)	Ämnen i fast form (ej pipetterbara)	Vätskor och viskösa ämnen (pipetterbara)	Ämnen i fast form (ej pipetterbara)
Modellyta	0,6 cm ²	0,6 cm ²	0,5 cm ²	0,5 cm ²
Antal vävnadsreplik	Minst två	Minst två	Minst två	Minst två
Förkontroll av eventuell färginterferens	50 µl + 1 ml H₂O i 60 min. vid $37 \pm 2^\circ\text{C}$, $5 \pm 1\%$ CO₂, $\geq 95\%$ relativ luftfuktighet (ofärgade testkemikalier), eller 50 µl + 2 ml isopropanol blandade i 2–3 timmar vid rumstemperatur (färgade testkemikalier) → om testkemikaliens OD vid 570 ± 20 nm, efter subtraktion av OD för isopropanol eller vatten är $> 0,08$ (vilket motsvarar ungefär 5 % av den negativa kontrollens genomsnittliga OD-värde), bör anpassade kontroller med levande vävnad genomföras.	50 mg + 1 ml H₂O i 60 min. vid $37 \pm 2^\circ\text{C}$, $5 \pm 1\%$ CO₂, $\geq 95\%$ relativ luftfuktighet (ofärgade testkemikalier), och/eller 50 mg + 2 ml isopropanol blandade i 2–3 timmar vid rumstemperatur (färgade och ofärgade testkemikalier) → om testkemikaliens OD vid 570 ± 20 nm, efter subtraktion av OD för isopropanol eller vatten, är $> 0,08$ (vilket motsvarar ungefär 5 % av den negativa kontrollens genomsnittliga OD-värde), bör anpassade kontrolltester med levande vävnad genomföras.	10 µl + 90 µl H₂O blandade i 30 ± 2 min. vid rumstemperatur (RT, 18–28 °C) → om testkemikalien är färgad, bör anpassade kontroller med levande vävnad genomföras	10 mg + 90 µl H₂O blandade i 30 ± 2 min. vid rumstemperatur → om testkemikalien är färgad, bör anpassade kontroller med levande vävnad genomföras

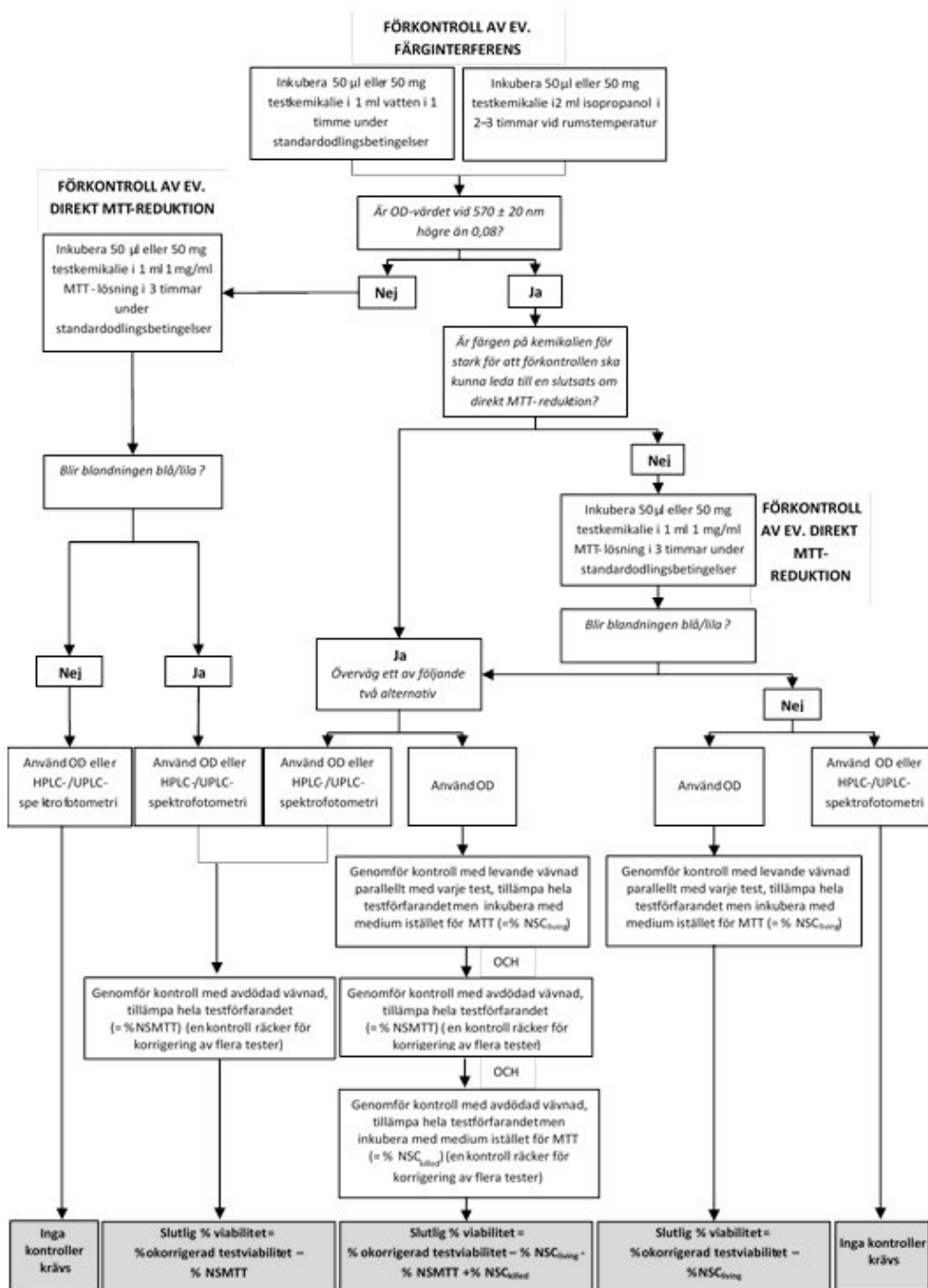
Testdelar	EpiOcular™ EIT (VRM1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM2)	
Förkontroll av eventuell direkt MTT-reduktion	50 µl + 1 ml av 1 mg/ml MTT-lösning under 180 ± 15 min. vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % relativ luftfuktighet → om lösningen blir blå/lila, bör anpassade kontroller med frysad vävnad utföras (50 µl sterilt avjoniserat vatten i MTT-lösning används då som negativ kontroll)	50 mg + 1 ml av 1 mg/ml MTT-lösning under 180 ± 15 min. vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % relativ luftfuktighet → om lösningen blir blå/lila, bör anpassade kontrolltester med frysad vävnad utföras (50 µl sterilt avjoniserat vatten i MTT-lösning används då som negativ kontroll)	30 µl + 300 µl av 1 mg/ml MTT-lösning i 180 ± 15 min. vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % relativ luftfuktighet → om lösningen blir blå/lila, bör anpassade kontroller med vattendödad vävnad utföras (30 µl sterilt avjoniserat vatten i MTT-lösning används då som negativ kontroll)	30 mg + 300 µl av 1 mg/ml MTT-lösning i 180 ± 15 min. vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % relativ luftfuktighet → om lösningen blir blå/lila, bör anpassade kontroller med vattendödad vävnad utföras (30 µl sterilt avjoniserat vatten i MTT-lösning används då som negativ kontroll)
Förbehandling	20 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -fri DPBS i 30 ± 2 min. vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % relativ luftfuktighet, skyddad från ljus.	20 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -fri DPBS i 30 ± 2 min. vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % relativ luftfuktighet, skyddad från ljus.	–	–
Behandlingsdoser och applicering	50 µl (83,3 µl/cm ²)	50 mg (83,3 mg/cm ²)	10 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -fri DPBS + 30 ± 2 µl (60 µl/cm ²) För viskösa ämnen, använd ett nylonnät	30 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -fri DPBS + 30 ± 2 mg (60 mg/cm ²)
Exponering, tid och temperatur	30 min. (± 2 min.) i odlingsmedium vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % relativ luftfuktighet	6 timmar (± 0,25 timmar) i odlingsmedium vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % relativ luftfuktighet	30 min. (± 2 min.) i odlingsmedium vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % relativ luftfuktighet	4 timmar (± 0,1 timmar) i odlingsmedium vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % relativ luftfuktighet
Sköljning vid rumstemperatur	3 gånger i 100 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -fri DPBS	3 gånger i 100 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -fri DPBS	20 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -fri DPBS	25 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -fri DPBS
Nedsänkning efter exponering	12 min. (± 2 min.) vid rumstemperatur i odlingsmedium	25 min. (± 2 min.) vid rumstemperatur i odlingsmedium	30 min. (± 2 min.) vid 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % relativ luftfuktighet, i odlingsmedium	30 min. (± 2 min.) vid rumstemperatur i odlingsmedium

Testdelar	EpiOcular™ EIT (VRM1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM2)	
Inkubation efter exponering	120 min. (± 15 min.) i odlingsmedium vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % relativ luftfuktighet	18 timmar (± 0,25 timmar) i odlingsmedium vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % relativ luftfuktighet	Ingen	18 timmar (± 0,5 h) i odlingsmedium vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % relativ luftfuktighet
Negativ kontroll	50 µl H ₂ O Testas parallellt	50 µl H ₂ O Testas parallellt	30 ± 2 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -fri DPBS Testas parallellt	30 ± 2 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -fri DPBS Testas parallellt
Positiv kontroll	50 µl metylacetat Testas parallellt	50 µl metylacetat Testas parallellt	30 ± 2 µl metylacetat Testas parallellt	30 ± 2 µl metylacetat Testas parallellt
MTT-lösning	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT-inkubation, tid och temperatur	180 min. (± 15 min.) vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % relativ luftfuktighet	180 min. (± 15 min.) vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % relativ luftfuktighet	180 min. (± 15 min.) vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % relativ luftfuktighet	180 min. (± 15 min.) vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 % relativ luftfuktighet
Extraktionsmedel	2 ml isopropanol (extraktion av iläggets topp och botten genom att sticka hål på vävnaden)	2 ml isopropanol (extraktion av iläggets botten genom att sticka hål på vävnaden)	1,5 ml isopropanol (extraktion av iläggets topp och botten)	1,5 ml isopropanol (extraktion av iläggets botten)
Extraktion, tid och temperatur	2–3 timmar med skak (~120 rpm) vid rumstemperatur eller över natt vid 4–10 °C	2–3 timmar med skak (~120 rpm) vid rumstemperatur eller över natt vid 4–10 °C	4 timmar med skak (~120 rpm) vid rumstemperatur eller åtminstone över natt utan skak vid 4–10 °C	Minst 2 timmar med skak (~120 rpm) vid rumstemperatur
Avläsning av optisk densitet	570 nm (550–590 nm) utan referensfilter	570 nm (550–590 nm) utan referensfilter	570 nm (540–600 nm) utan referensfilter	570 nm (540–600 nm) utan referensfilter
Kvalitetskontroll av vävnaden	Behandling med 100 µl 0,3-volymprocentig Triton X-100 12,2 min. ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 min.	Behandling med 100 µl 0,3-volymprocentig Triton X-100 12,2 min. ≤ ET ₅₀ ≤ 37,5 min.	30 min. behandling med SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,5 mg/ml	30 min. behandling med SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,2 mg/ml

Testdelar	EpiOcular™ EIT (VRM1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM2)	
Acceptanskriterier	1. Genomsnittligt OD-värde för de vävnadsreplikater som behandlats med negativ kontroll ska vara $> 0,8$ och $< 2,5$. 2. Genomsnittlig viabilitet hos de vävnadsreplikater som exponerats för positiv kontroll under 30 min, uttryckt i procent av negativ kontroll, ska vara $< 50\%$. 3. Skillnaden i viabilitet mellan två vävnadsreplikater ska vara mindre än 20%.	1. Genomsnittligt OD-värde för de vävnadsreplikater som behandlats med negativ kontroll ska vara $> 0,8$ och $< 2,5$. 2. Genomsnittlig viabilitet hos de vävnadsreplikater som exponerats för positiv kontroll under 6 timmar, uttryckt i procent av negativ kontroll, ska vara $< 50\%$. 3. Skillnaden i viabilitet mellan två vävnadsreplikater ska vara mindre än 20%.	1. Genomsnittligt OD-värde för de vävnadsreplikater som behandlats med negativ kontroll ska vara $> 1,0$ och $\leq 2,5$. 2. Genomsnittlig viabilitet hos de vävnadsreplikater som exponerats för positiv kontroll under 30 min, uttryckt i procent av negativ kontroll, ska vara $\leq 30\%$. 3. Skillnaden i viabilitet mellan två vävnadsreplikater ska vara mindre än 20%.	1. Genomsnittligt OD-värde för de vävnadsreplikater som behandlats med negativ kontroll ska vara $> 1,0$ och $\leq 2,5$. 2. Genomsnittlig viabilitet hos de vävnadsreplikater som exponerats för positiv kontroll under 4 timmar, uttryckt i procent av negativ kontroll, ska vara $\leq 20\%$. 3. Skillnaden i viabilitet mellan två vävnadsreplikater ska vara mindre än 20%.

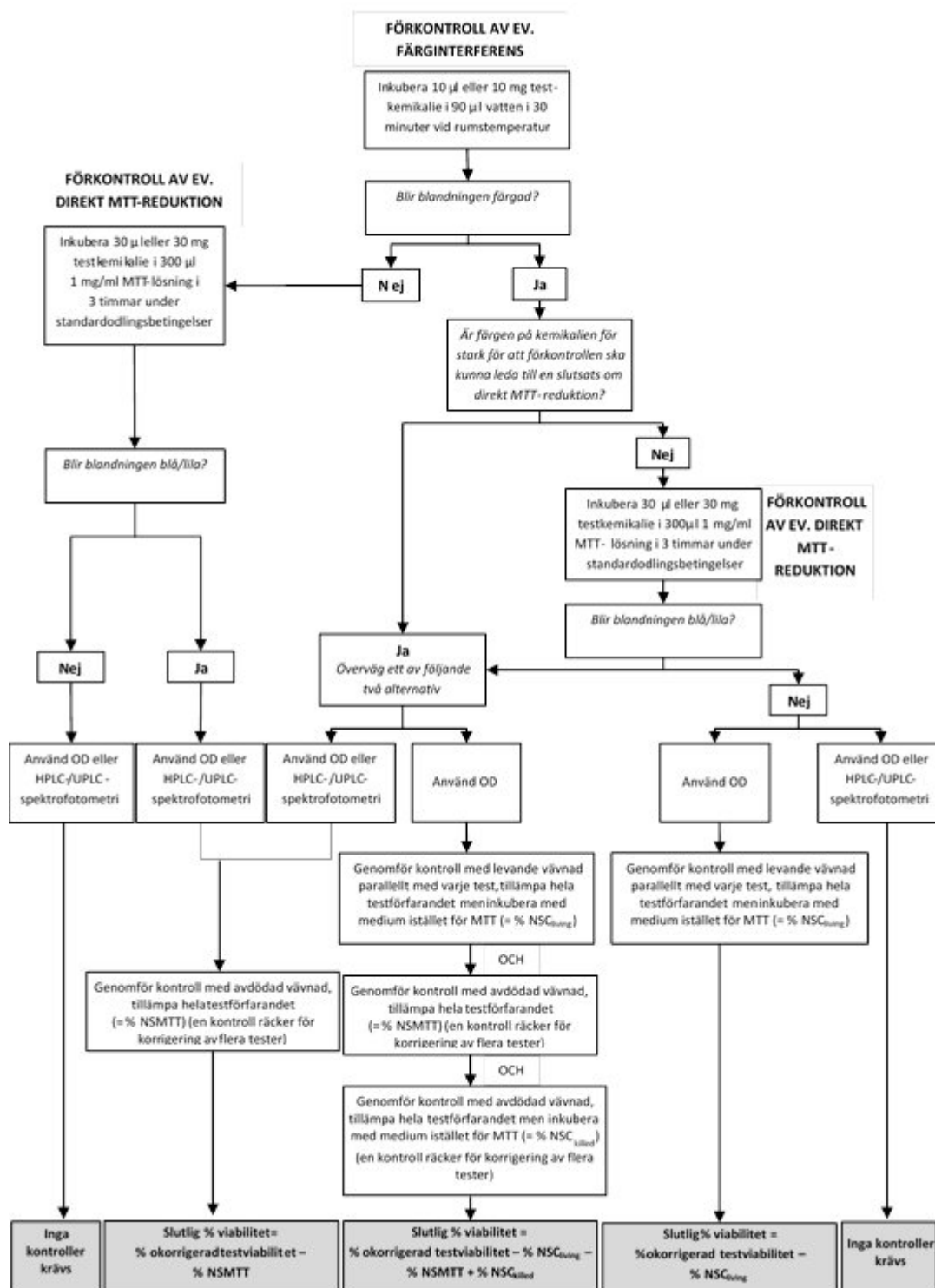
Tillägg 3

ILLUSTRERANDE FLÖDESSCHEMA SOM GER VÄGLEDNING I HUR MAN IDENTIFIERAR OCH HANTERAR DIREKT MTT-REDUCERANDE ÄMNE OCH/ELLER FÄRGINTERFERERANDE KEMIKALIER, BASERAT PÅ STANDARDFÖRFARANDET FÖR VRM1



Tillägg 4

ILLUSTRERANDE FLÖDESSCHEMA SOM GER VÄGLEDNING I HUR MAN IDENTIFIERAR OCH HANTERAR DIREKT MTT-REDUCERANDE ÄMNEN OCH/ELLER FÄRGINTERFERERANDE KEMIKA LIER, BASERAT PÅ STANDARDFÖRFARANDET FÖR VRM2



Tillägg 5

NYCKELPARAMETRAR OCH ACCEPTANSKRITERIER FÖR KVALIFICERING AV ETT SPEKTROFOTOMETRISKT HPLC-/UPLC-SYSTEM FÖR MÄTNING AV MTT- FORMAZAN EXTRAHERAD FRÅN RHCE-VÄVNAD

Parameter	Protokoll baserat på FDA-vägledning (36) (38)	Acceptanskriterier
Selektivitet	Analys av isopropanol, levande blankprov (isopropanolextrakt från levande RhCE-vävnad utan någon behandling), dött blankprov (isopropanolextrakt från avdödad RhCE-vävnad utan någon behandling), och av ett färgämne (t.ex. metylenblått)	$\text{Area}_{\text{interference}} \leq 20 \% \text{ av } \text{area}_{\text{LLOQ}}^1$
Precision	Kvalitetskontroller (dvs. MTT-formazan vid 1,6 µg/ml, 16 µg/ml och 160 µg/ml) i isopropanol (n = 5)	$\text{CV} \leq 15 \% \text{ eller } \leq 20 \% \text{ för LLOQ}$
Exakthet	Kvalitetskontroller i isopropanol (n = 5)	$\% \text{ Dev} \leq 15 \% \text{ eller } \leq 20 \% \text{ för LLOQ}$
Matriseffekt	Kvalitetskontroller i levande blankprov (n = 5)	$85 \% \leq \% \text{ matriseffekt} \leq 115 \%$
Överföring	Analys av isopropanol mot en ULOQ ² -standard	$\text{Area}_{\text{interference}} \leq 20 \% \text{ av } \text{area}_{\text{LLOQ}}$
Reproducerbarhet (inom en dag)	Tre oberoende kalibreringskurvor (baserade på 6 konsekutiva 1/3-spädningar av MTT-formazan i isopropanol med början vid ULOQ, dvs. 200 µg/ml); Kvalitetskontroller i isopropanol (n = 5)	Kalibreringskurvor: $\% \text{ Dev} \leq 15 \% \text{ eller } \leq 20 \% \text{ för LLOQ}$ Kvalitetskontroller: $\% \text{ Dev} \leq 15 \% \text{ och } \text{CV} \leq 15 \%$
Reproducerbarhet (mellan dagar)	Dag 1: En kalibreringskurva och kvalitetskontroller i isopropanol (n = 3) Dag 2: En kalibreringskurva och kvalitetskontroller i isopropanol (n = 3) Dag 3: En kalibreringskurva och kvalitetskontroller i isopropanol (n = 3)	
Kortidsstabilitet för MTT-formazan i RhCE-vävnadsextrakt	Kvalitetskontroller i levande blankprov (n = 3), analyserade på beredningsdagen och efter 24 timmars förvaring i rumstemperatur	$\% \text{ Dev} \leq 15 \%$
Långtidsstabilitet för MTT-formazan i RhCE-vävnadsextrakt, om det krävs	Kvalitetskontroller i levande blankprov (n = 3), analyserade på beredningsdagen och efter några dygns förvaring i – 20 °C	$\% \text{ Dev} \leq 15 \%$

¹ LLOQ: Nedre kvantifieringsgräns (Lower Limit of Quantification) fastställd att täcka 1–2 % vävnadsviabilitet, det vill säga 0,8 µg/ml.

² ULOQ: Övre kvantifieringsgräns (Upper Limit of Quantification) fastställd att åtminstone vara två gånger högre än den högsta förväntade MTT-formazan-koncentrationen i isopropanolextrakt från negativa kontroller (~70 µg/ml i VRM), det vill säga 200 µg/ml.

B.70 IN VITRO-TESTER MED HUMAN REKOMBINANT ÖSTROGENRECEPTOR (hrER) FÖR ATT DETEKTERA KEMIKAlier MED BINDNINGSAFFINITET TILL ÖSTROGENRECEPTOR

ALLMÄN INLEDNING

OECD:s prestandabaserade testriktlinje

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 493 (2015). Testriktlinje 493 är en prestandabaserad testriktlinje (PBTG) som beskriver metodologin för *in vitro*-tester med humant rekombinant material för att detektera ämnen med bindningsaffinitet till östrogenreceptor (hrER-bindningstester). Den består av två mekanistiskt och funktionellt likartade tester för identifiering av ämnen som binder till östrogenreceptor α (dvs. ER α) och ska underlätta utvecklingen av nya, liknande eller modifierade tester som överensstämmer med de principer för validering som fastställts i OECD:s vägledningsdokument *Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment* (1). De fullständigt validerade referenstestmetoder (tillägg 2 och tillägg 3) som utgör grunden för denna PBTM är följande:

- Freyberger-Wilsons (FW) *in vitro*-test av östrogenreceptorbindning (östrogenreceptor, ER) med human, rekombinant fullängds-ER α (2), och
- Chemical Evaluation and Research Institutes (CERI) *in vitro*-test av östrogenreceptorbindning med humant, rekombinant, ligandbindande domänprotein (2).

Prestandastandarder (PS) (3) finns tillgängliga för att underlätta utvecklingen och valideringen av liknande testmetoder för samma faro-endpoint och möjliggöra tillägg till PBTG 493 vid lämplig tidpunkt så att nya liknande tester kan fogas till en uppdaterad PBTG. Men liknande tester kommer att läggas till först efter OECD:s granskning och godkännande av att prestandastandarderna uppfylls. De tester som ingår i TG 493 kan användas utan förbehåll för att bemöta OECD-medlemsländers krav på testresultat för östrogenreceptorbindning genom att dra nytta av OECD:s ömsesidiga acceptans av data.

Bakgrund och principer för de tester som ingår i denna testmetod

2. OECD inledde en högprioriterad verksamhet under 1998 för att se över befintliga, och ta fram nya, testriktlinjer för screening och testning av potentiellt hormonstörande kemikalier. OECD:s begreppsram för provning och bedömning av potentiellt hormonstörande kemikalier reviderades 2012. De ursprungliga och reviderade ramarna ingår som bilagor i *Guidance document on standardised test guidelines for evaluating chemicals for endocrine disruption* (4). Ramen har fem nivåer, vilka motsvarar olika nivåer av biologisk komplexitet. De ER-bindningstester som beskrivs i denna testmetod ligger på nivå 2, vilken omfattar *in vitro*-tester som ger information om utvalda hormonella mekanism(er)/signalväg(ar). Denna testmetod är avsedd för *in vitro*-tester av

receptorbindning som är utformade för att identifiera ligander till den humana östrogenreceptorn alfa (ER α).

3. Relevansen hos *in vitro*-ER-bindningstestet för biologisk funktion har påvisats tydligt. ER-bindningstester är utformade för att identifiera kemikalier som har potential att störa östrogenhormonsignalvägen och har använts i stor omfattning under de två senaste decennierna för att karakterisera distribution av ER-vävnad samt för att identifiera ER-agonister/antagonister. Dessa tester återspeglar ligand–receptorinteraktionen som är det inledande steget i östrogensignalvägen och är avgörande för reproduktiva funktioner hos alla ryggradsdjur.
4. Interaktionen mellan östrogen och östrogenreceptorer kan påverka transkriptionen av östrogenkontrollerade gener och inducera icke-genomiska effekter, vilka kan leda till induktion eller inhibering av cellulära processer, inklusive de som behövs för celledelning, normal fosterutveckling och reproduktion (5) (6) (7). En störning av normala östrogensystem kan leda till skadliga effekter på normal utveckling (ontogenes), reproduktionshälsa och reproduktionssystemets tillstånd. Olämplig ER-signaleringskanal kan leda till sådana effekter som ökad risk för hormonberoende cancer, nedsatt fertilitet samt förändringar i fostertillväxt och fosterutveckling (8).
5. *In vitro*-bindningstester baseras på en direkt interaktion mellan ett ämne och en specifik, gentranskriptionsreglerande ligandbindningsplats på receptorn. Den viktigaste delen av östrogenreceptor alfa-bindningstestet med humant rekombinant östrogen (hrER α) mäter förmågan hos radioaktivt inmärkt ligand ([³H]-17 β -estradiol) att binda till ER i närvaron av ökande koncentrationer av testkemikalie (dvs. konkurrerande ligand). Testkemikalier med hög affinitet för ER konkurrerar med den radioaktivt inmärkte liganden vid en lägre koncentration än de kemikalier som har lägre affinitet för receptorn. Detta test består av två huvuddelar: ett mättnadsbindningsexperiment för att karakterisera receptor–ligandinteraktionsparametrar och fastställa ER-specifitet, följt av ett kompetitivt bindningsexperiment som karakteriserar konkurrensen mellan en testkemikalie och en radioaktivt inmärkt ligand vid inbindning till ER.
6. Valideringsstudier av CERI- och FW-bindningstesterna har visat att de är relevanta och tillförlitliga för det avsedda syftet (2).
7. Definitioner och förkortningar som används i denna testmetod beskrivs i tillägg 1.

Omfattning och begränsningar för receptorbindningstester

8. Dessa tester föreslås för screening- och prioriteringssyften men kan också ge information för en molekylär inledande händelse (Molecular Initiation Event, MIE) som kan användas vid en strategi med sammanvägd bedömning. Med hjälp av dem kan kemisk bindning till den ER α -ligandbindande domänen undersökas i ett *in vitro*-system. Därför ska resultat inte direkt extrapoleras till det intakta hormonella systemets komplexa signalering och reglering *in vivo*.

9. Inbindningen av den naturliga liganden, 17 β -estradiol, är det inledande steget i en serie molekylära händelser som aktiverar transkription av målgener och i slutänden kulminerar i fysiologiska förändringar (9). Därför betraktas bindning till den ER α -ligandbindande domänen som en av nyckelmekanismerna i ER-medierad hormonell störning (Endocrine Disruption, ED), även om det finns andra mekanismer genom vilka hormonell störning kan uppstå, inklusive i) interaktioner med andra platser på ER α än den ligandbindande fickan, ii) interaktioner med andra receptorer som är relevanta för östrogensignalering, ER- β och G-proteinkopplad östrogenreceptor, andra receptorer och enzymatiska system inom det hormonella systemet, iii) hormonsyntes, iv) metabol aktivering och/eller deaktivering av hormoner, v) transport av hormoner till målvävnader och vi) utsöndring av hormoner från kroppen. Inget av testerna i denna testmetod fokuserar på någon av dessa verkningsmekanismer.
10. Denna testmetod är inriktad på olika ämnens förmåga att binda till human ER α och skiljer inte mellan agonister respektive antagonister till ER α . Dessa tester är inte inriktade på vare sig vidare nedströms händelser, som gentranskription, eller fysiologiska förändringar. Med hänsyn till att endast monokomponentämnen användes i valideringen har inte möjligheten att testa blandningar inte behandlats. Teoretiskt är testerna emellertid tillämpliga på testning av multikomponentämnen och blandningar. Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett tillsynsändamål bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag.
11. Cellfria receptorsystem har ingen inneboende metabol förmåga och har inte validerats tillsammans med metabola enzymsystem. Men det kan vara möjligt att utforma en studie som inkorporerar metabol aktivitet, det fordrar dock ytterligare valideringsarbete.
12. Kemikalier som kan denaturera proteinet (dvs. receptorproteinet), som ytaktiva ämnen eller kemikalier som kan ändra testbuffertens pH, kan eventuellt inte testas eller kan endast testas vid koncentrationer där sådan interaktion inte äger rum. I övrigt begränsas koncentrationsintervallet inom vilket testkemikalien kan testas av kemikaliens löslighet i testbufferten.
13. Notera att i tabell 1 anges testresultaten för de 24 ämnen som testades i de båda fullständigt validerade testerna som beskrivs i denna testmetod. Av dessa ämnen har 17 klassificerats som ER-bindande och 6 som icke-bindande utifrån publicerade rapporter, inklusive *in vitro*-tester för ER-transkriptionsaktivering och/eller det uterotrofa testet (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). För de data som sammanfattas i tabell 1 var det nästan 100 % överensstämmelse mellan de två testerna kring klassificeringen av alla ämnen upp till 10⁻⁴ M, och varje ämne identifierades korrekt som antingen ER-bindande eller icke ER-bindande. Ytterligare information om denna grupp av ämnen, liksom andra ämnen som testats i ER-bindningstesterna i valideringsstudierna ges i prestandastandarderna för hER-bindningstestet (3) tillägg 2 (tabell 1, 2 och 3).

Tabell 1: Indelning av ämnen som ER-bindande eller icke ER-bindande, efter att de har testats i FW- och CERI-hrER-bindningstesterna med jämförelse av förväntad respons

	Ämnesnamn	CAS-nummer	Förväntad respons	FW-test		CERI-test		MESH, kemikalieklass	Produktklass
				Koncentrationsintervall (M)	Klassificering	Koncentrationsintervall (M)	Klassificering		
1	17 β -estradiol	50-28-2	Bindare	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Bindare	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Bindare	Steroid	Humant/veterinärt läkemedel
2	Noretynodrel	68-23-5	Bindare	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Bindare	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Bindare	Steroid	Humant/veterinärt läkemedel
3	Noretindron	68-22-4	Bindare	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Bindare	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Bindare	Steroid	Humant/veterinärt läkemedel
4	Di- <i>n</i> -butylftalat	84-74-2	Icke-bindare*	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Icke-bindare**†	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Icke-bindare**†	Kolväte (cykliskt), ester	Mjukgörare, kemisk intermediär
5	DES (dietylstilbestrol)	56-53-1	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	Kolväte (cykliskt), fenol	Humant/veterinärt läkemedel
6	17 α -etynylestradiol	57-63-6	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	Steroid	Humant/veterinärt läkemedel
7	Meso-hexestrol	84-16-2	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	Kolväte (cykliskt), fenol	Humant/veterinärt läkemedel
8	Genistein	446-72-0	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	Kolväte (heterocykliskt), flavonoid	Naturprodukt
9	Equol	531-95-3	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	Fytoöstrogenmetabolit	Naturprodukt
10	Butylparaben (<i>n</i> -butyl-4-hydroxibensoat)	94-26-8	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	Paraben	Konserveringsmedel
11	Nonylfenol (blandning)	84852-15-3	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	Alkylfenol	Intermediär
12	<i>o,p'</i> -DDT	789-02-6	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	Organisk klorförening	Insekticid
13	Kortikosteron	50-22-6	Icke-bindare*	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Icke-bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Icke-bindare	Steroid	Naturprodukt
14	Zearalenon	17924-92-4	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	Kolväte (heterocykliskt), lakton	Naturprodukt
15	Tamoxifen	10540-29-1	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	Kolväte (cykliskt)	Humant/veterinärt läkemedel
16	5 α -dihydrotestosteron	521-18-6	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	Steroid, icke-fenolisk	Naturprodukt
17	Bisfenol A	80-05-7	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	Fenol	Kemisk intermediär
18	4- <i>n</i> -heptylfenol	1987-50-4	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Tvetydig ^a	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	Alkylfenol	Intermediär
19	Kepon (klordekon)	143-50-0	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Bindare	Kolväten (halogenerad)	Bekämpningsmedel
20	Bens(a)antracen	56-55-3	Icke-bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Icke-bindare ^b	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Icke-bindare ^b	Aromatiskt kolväte	Intermediär

2 1	Enterolakton	78473-71-9	Bindare	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Bindare	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Bindare	Fytoöstrogen	Naturprodukt
2 2	Progesteron	57-83-0	Icke-bindare*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Icke-bindare	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Icke-bindare	Steroid	Naturprodukt
2 3	Oktyltriotoxisilan	2943-75-1	Icke-bindare	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Icke-bindare	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Icke-bindare	Silan	Ytbehandlingsmedel
2 4	Atrazin	1912-24-9	Icke-bindare*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Icke-bindare	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Icke-bindare	Heterocykliskt ämne	Ogräsbekämpningsmedel

* Löslighetsgräns $< 1 \times 10^{-4}$ M.

* Användningen och klassificeringen av di-n-butylftalat (DBP) som en icke-bindare baserades på tester upp till 10^{-4} M eftersom ämnet hade noterats som olösligt vid 10^{-3} M (t.ex. turbiditet) i en del laboratorier under pre-valideringsstudier.

† Under valideringsstudien testades di-n-butylftalat (DBP) som ett kodat testämne i koncentrationer upp till 10^{-3} M. Under dessa förhållanden observerades vid några laboratorier antingen en minskning i radioligandbindning vid den högsta koncentrationen (10^{-3} M) och/eller en tvetydig kurvanpassning. För dessa testomgångar klassificerades DBP som "tvetydig" eller "bindare" i 3/5 av de laboratorier som använde CERI-testet och 5/6 av de laboratorier som använde FW-testet (se referens 2), avsnitt IV.B. 3 a, b och VI.A).

^a Klassificeringen överensstämde inte med förväntad klassificering. Klassificeringen av 4-n-heptylphenol som "tvetydig" eller "icke-bindare" av 3/5 av laboratorierna gav en genomsnittlig klassificering som tvetydig. En närmare undersökning visade att detta berodde på begränsningar i kemisk löslighet vilka förhindrade upprättande av en fullständig bindningskurva.

^b Under valideringsstudien omklassificerades bens(a)antracen som icke-bindare (dvs. negativ) baserat på publicerad litteratur som visade att den östrogena aktivitet *in vitro* som rapporterats för detta ämne (16) främst uppkommer genom metabol aktivering (17)(18). Enzymatisk metabol aktivering av ämnet förväntas inte i de cellfria hrEr-bindningstester som användes i denna inter-valideringsstudie. Därför är den korrekta klassificeringen av detta ämne "icke-bindare" när det används under de experimentella förhållanden som gäller för FW- och CERI-tester.

hrER-BINDNINGSTESTETS DELAR

Viktiga testdelar

14. Denna testmetod gäller tester som använder en ER-receptor och en lämpligt stark receptorligand som kan användas som en markör/spårsubstans i testet och kan trängas bort vid högre koncentrationer av en testkemikalie. I bindningstester ingår två huvuddelar: 1) mättnadsbindning och 2) kompetitiv bindning. Mättnadsbindningstestet används för att bekräfta receptorberedningarnas specificitet och aktivitet, medan den kompetitiva delen av experimentet används för att utvärdera testkemikaliens förmåga att binda till hrER.

Kontroller

15. Grunden för föreslagna parallella östrogenreferenser och kontroller bör beskrivas. Parallellt löpande kontroller (lösningsmedel [vehikel], positiv [ER-bindare, stark resp. svag affinitet], negativ [icke-bindare]), utifrån omständigheter, tjänar som en indikation på att testet fungerar under testbetingelserna och utgör en grund för jämförelser mellan experiment, vanligen ingår de bland acceptanskriterierna för ett visst experiment (1). Fullständiga koncentrationskurvor för östrogenreferens och kontroller (dvs. svag bindare resp. icke-bindare) ska placeras i en platta vid varje testomgång. Alla andra plattor ska innehålla: 1) en hög koncentration (ungefär fullständig bortträngning av radioaktivt inmärkt ligand) och en mellankoncentration (ungefär IC_{50}) av E2 respektive svag bindare i tripletter, 2) lösningsmedelskontroll och icke-specifik bindning, båda som tripletter.

Rutinmässig kvalitetskontroll

16. Rutinmässiga kvalitetskontroller ska utföras som beskrivits för varje test för att säkerställa att receptorerna är aktiva, kemikalier har rätt koncentrationer, toleransgränser förblir stabila genom flera upprepningar och för att bibehålla förmågan till att ge förväntade ER-bindningsresponser över tid.

Uppvisande av laboratoriets färdighet

17. Innan okända kemikalier kan testas med något av testerna i denna testmetod ska varje laboratorium uppvisa färdighet i att använda testet genom att göra mättnadstester som bekräftar ER-beredningens aktivitet och specificitet, samt kompetitiva bindningstester med östrogenreferensen och kontroller (svag bindare och icke-bindare). Laboratoriet ska upprätta en historisk databas med resultat för östrogenreferensen och kontrollerna, upprättad utifrån 3–5 oberoende experiment genomförda under skilda dagar. Dessa experiment kommer att utgöra grunden för laboratoriets östrogenreferenser och historiska kontroller och kommer att användas som en delbedömning för godkännande av senare testomgångar.
18. Testsystemets responsivitet kommer också att bekräftas genom tester av de kvalifikationsämnen som anges i tabell 2. Förteckningen över kvalifikationsämnen är en undergrupp av referensämnen som anges i prestandastandarderna för ER-bindningstester (3). Dessa ämnen är kommersiellt tillgängliga, representerar de grupper av kemikalier som vanligen förknippas med ER-bindande aktivitet och bildar ett lämpligt intervall av förväntad styrka på ER-bindning (dvs. stark till svag) och icke-bindning (dvs. negativa svar). Varje kvalifikationsämne ska testas i koncentrationer vilka täcker intervallet som anges i tabell 2. Minst tre experiment ska genomföras för varje ämne och resultaten ska överensstämma med förväntad kemisk aktivitet. Varje experiment ska utföras oberoende (dvs. med färsk spädning av receptor, kemikalier och reagens), med tre replikat för varje koncentration. Färdighet uppvisas genom korrekt klassificering (positiv/negativ) av alla kvalifikationsämnen. Färdighetstesterna ska utföras av varje laboratorietekniker i samband med att han/hon lär sig testförfarandet.

Tabell 2: Förteckning över kontroller och kvalifikationsämnen för kompetitiva bindningstester med hrER¹

Nr	Ämnesnamn	CAS-nummer ²	Förväntad respons ^{3,4}	Testkoncentrationsintervall (M)	MeSH kemisk klass ⁵	Produktklass ⁶
Kontroller (östrogenerferens, svag bindare, icke-bindare)						
1	17 β -estradiol	50-28-2	Bindare	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Steroid	Humant/veterinärt läkemedel
2	Noretynodrel (eller) Noretindron	68-23-5 (eller) 68-22-4	Bindare	3×10^{-9} – 30×10^{-6}	Steroid	Humant/veterinärt läkemedel
3	Oktyltriotoxisilan	2943-75-1	Icke-bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Silan	Ytbehandlingsmedel
Kvalifikationsämnen⁶						
4	Dietylstilbestrol	56-53-1	Bindare	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Kolväte (cykliskt), fenol	Humant/veterinärt läkemedel
5	17 α -etynylestradiol	57-63-6	Bindare	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Steroid	Humant/veterinärt läkemedel
6	Meso-hexestrol	84-16-2	Bindare	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Kolväte (cykliskt), fenol	Humant/veterinärt läkemedel
7	Tamoxifen	10540-29-1	Bindare	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Kolväte (cykliskt)	Humant/veterinärt läkemedel
8	Genistein	446-72-0	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Heterocykliskt ämne, flavonoid	Naturprodukt
9	Bisfenol A	80-05-7	Bindare	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Fenol	Kemisk intermediär
10	Zearalolon	17924-92-4	Bindare	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Heterocykliskt ämne, lakton	Naturprodukt

11	Butylparaben	94-26-8	Bindare	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Karboxylsyra, fenol	Konserveringsmedel
12	Atrazin	1912-24-9	Ikke-bindare	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Heterocykliskt ämne	Ogräsbekämpningsmedel
13	Di-n-butylftalat (DBP) ⁷	84-74-2	Ikke-bindare ⁸	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Kolväte (cykliskt), ester	Mjukgörare, kemisk intermediär
14	Kortikosteron	50-22-6	Ikke-bindare	1×10^{-11} – 1×10^{-4}	Steroid	Naturprodukt

¹ Om ett kvalifikationsämne inte längre finns kommersiellt tillgängligt kan man använda ett ämne med samma ER-bindningsklassificering, jämförbar styrka och ur samma kemiska klass.

² Förkortningar: CAS-nummer: nummer i registret som förs av Chemical abstracts service.

³ Klassificering som ER α -bindare eller ikke-bindare i valideringsstudien för CERI- och FW-hrER-bindningstester (2).

⁴ ER-bindningsaktivitet baserades på amerikanska ICCVAM:s Background review documents (BRD) för ER-bindnings- och TA-tester (9) liksom på empiriska data och annan information från publicerade och refererade granskade studier (10) (11) (12) (13) (14) (15).

⁵ Ämnena delades in i en eller flera kemiska klasser utifrån Förenta staternas National Library of Medicines Medical Subject Headings (MeSH), ett internationellt erkänt standardiserat klassificeringssystem (tillgängligt på: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁶ Ämnena delades in i en eller flera produktklasser utifrån Förenta staternas National Library of Medicines Hazardous Substances Database (finns på <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

⁷ DPB kan användas som alternativ ikke-bindande kontroll och då testas med maxkoncentration om 10^{-4} M.

⁸ Gränsen för detta ämnes löslighet är 10^{-4} M. Användningen och klassificeringen av di-n-butylftalat (DBP) som en ikke-bindare baserar sig på tester upp till 10^{-4} M eftersom ämnet hade noterats som olösligt vid 10^{-3} M (t.ex. turbiditet) i en del laboratorier under pre-valideringsstudier.

Löslighetstester och fastställande av koncentrationsintervall för testkemikalier

19. Ett preliminärt test bör genomföras för att fastställa löslighetsgränsen för varje testkemikalie och för att identifiera lämpligt koncentrationsintervall att använda sig av under testet. Samtliga testkemikaliers respektive löslighetsgräns i lösningsmedlet ska fastställas initialt och vidare bekräftas under testbetingelser. Slutkoncentrationen i testet bör inte överstiga 1 mM. Lämpligt intervall söks med tester som utgörs av en lösningsmedelskontroll och åtta logaritmiska seriespädningar, där man börjar med maximal acceptabel koncentration (t.ex. 1 mM eller lägre, baserat på löslighetsgräns), och närvaron av grumlighet eller fällning. Koncentrationer i det andra och tredje experimenten bör anpassas för en bättre karakterisering av koncentration–responskurvan.

Acceptanskriterier för testomgångar

20. Godkännande eller avvisande av en testomgång baseras på utvärderingen av resultaten för den östrogenreferens och kontroll som används i varje experiment. För det första, för platta 1 ska kompletta koncentrationskurvor för referenskontrollerna från varje experiment motsvara prestandamätningarna med kurvanpassningsparametrar (t.ex. IC_{50} och Hill-koefficient [Hill slope]) utifrån resultaten som rapporteras för respektive protokoll för CERI- och FW-testerna (tillägg 2 och 3) och historiska kontrolldata från laboratoriet som genomför testet. Alla kontroller (östrogenreferens, svag bindare och icke-bindare) ska klassificeras korrekt vid varje experiment. För det andra ska man skatta överensstämmelsen hos kontrollerna på alla påföljande plattor med dem på platta 1. Vidare ska man använda ett tillräckligt intervall av testkemikaliens koncentration för att klart kunna beskriva toppen på kurvan för kompetitiv bindning. Variationen mellan replikat vid varje koncentration av testkemikalien, liksom mellan de tre oberoende testomgångarna, ska vara rimlig och vetenskapligt försvarbar. Förmågan att genomföra testet konsekvent ska uppvisas genom upprättande och underhåll av en historisk databas för östrogenreferensen och kontroller. Standardavvikelser (SD) eller variationskoefficienter (CV) för medelvärdena för referensöstrogen och kurvanpassningsparametrar för kontrollkurvor för svaga bindare från flera experiment kan användas som ett mått på reproducerbarhet inom laboratoriet. Yrkesmässigt omdöme ska tillämpas vid granskning av kontrollresultaten på plattan, från varje testomgång, liksom för varje testkemikalie.

Vidare ska följande principer kring acceptanskriterier tillämpas:

- Data ska vara tillräckliga för en kvantitativ skattning av ER-bindning.
- Testkoncentrationerna ska vara inom testkemikaliens löslighetsintervall.

Dataanalys

21. Det fastställda förfarandet för dataanalys av mättnad respektive kompetitiv bindning ska följa huvudprinciperna för karakterisering av receptor–ligand-interaktioner. Vanligen analyseras mättnadsbindningsdata med en icke-linjär regressionsmodell som tar hänsyn till total och icke-specifik bindning. En korrigering för ligandförbrukning (t.ex. Swillens, 1995 [19]) kan

behövas vid fastställande av Bmax och Kd. Data från tester av kompetitiv bindning omvandlas oftast (t.ex. procent specifik bindning och testkemikaliekoncentration [log M]). Skattningar av log(IC₅₀)-värdet för varje testkemikalie ska göras med hjälp av en lämplig programvara för icke-linjär kurvanpassning med anpassning till en fyraparameters Hill-ekvation. Efter en inledande analys ska kurvanpassningsparametrarna för bindningsdata tas fram samt en visuell granskning göras av hur väl den upprättade kurvan över kompetitiv bindning speglar bindningsdata. I en del fall kan ytterligare analys krävas för att erhålla bästa kurvanpassning (t.ex. genom att begränsa [constrain] kurvans topp och/eller botten, använda 10-procentsregeln, se tillägg 4 och referens 2 (avsnitt III.A.2)).

22. Om testsystemet motsvarar acceptanskriterierna (punkt 20) är det en indikation på att testsystemet fungerar korrekt, men det säkerställer inte att ett specifikt test ger korrekta data. En upprepning av det första testets korrekta resultat är den bästa indikationen på att producerade data är korrekta.

Generella kriterier för tolkning av data

23. För närvarande finns ingen allmänt överenskommen metod för att tolka ER-bindningsdata. Men både kvalitativa (t.ex. bindare/icke-bindare) och/eller kvantitativa skattningar (t.ex. log[IC₅₀]-värde, relativ bindningsaffinitet [RBA] osv.) av hrER-medierad aktivitet bör baseras på empiriska data och gott vetenskapligt omdöme.

Testrapport

24. Testrapporten ska innehålla följande information:

Test

- Använt test.

Kontroll/referens/testkemikalie

- Källa, satsnummer, sista förbrukningsdag, om detta anges.
- Testkemikalies stabilitet i sig, om den är känd.
- Löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet, om detta är känt.
- Mätning av pH, osmolalitet och utfällningar i det odlingsmedium till vilket testkemikalien tillsattes, i förekommande fall.

Monokomponentämne

- Fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.
- Kemiska beteckningar, såsom IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet, kemisk identitet för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.

Multikomponentämne, UVCB-ämnena och blandningar

- Karakteriseras så långt det är möjligt genom kemisk identitet (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.

Lösningsmedel/vehikel

- Karakterisering (typ, leverantör och sats).
- Motivering för val av lösningsmedel/vehikel.
- Testkemikaliens löslighet och stabilitet i lösningsmedlet/vehikeln, om dessa är kända.

Receptorer

- Källa till receptorer (leverantör, katalognr, sats, receptortyp, koncentration av aktiv receptor enligt leverantören, certifikat från leverantör).
- Karakterisering av receptorer (inklusive mättnadsbindningsresultat): K_d , B_{max} .
- Förvaring av receptorer.
- Radioaktivt inmärkt ligand.
- Leverantör, katalognr, sats, specifik aktivitet.

Testbetingelser

- Löslighetsbegränsningar under testbetingelser.
- Bindningsbuffertens sammansättning.
- Receptorkoncentration.
- Koncentration av spårsubstans (dvs. radioaktivt inmärkt ligand).
- Testkemikaliens koncentration.
- Procent vehikel i slutligt test.
- Inkubationstemperatur och tid.
- Separationsmetod bunden/fri.
- Positiva och negativa kontroller/referensämnen.
- Kriterier för när tester ska anses som positiva, negativa eller tvetydiga.

Acceptanskontroll

- Faktiska värden för IC_{50} och Hill-koefficient (Hill slope) för parallella positiva kontroller/referensämnen.

Resultat

- Rådata och data för bunden/fri.
- Bekräftelsekontroll av denaturering, om tillämpligt.

- Om det finns tillgängligt, lägsta effektiva koncentration (LEC).
- RBA och/eller IC_{50} -värden, där det är lämpligt.
- Koncentration–responsförhållande, där det är möjligt.
- Statistiska analyser, om några sådana finns, tillsammans med mått på fel och konfidens (t.ex. SEM, SD, CV eller 95 % CI) och en beskrivning av hur dessa värden har erhållits.

Diskussion kring resultaten

- Applicering av 10-procentsregeln.

Slutsats

LITTERATUR

- (1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.
- (2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.
- (3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.
- (4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.
- (5) Cavaillès V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: s. 20-6.
- (6) Welboren W.J., m.fl. (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer.*, 16(4): s. 1073–89.
- (7) Younes M. och Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): s. 63-6.
- (8) Diamanti-Kandarakis m.fl. (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, *Endo Rev* 30(4):293-342.
- (9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH-publikation nr 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.
- (10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

- (12) Akahori Y. m.fl. (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 225-231.
- (13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.
- (14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. s. 1–188.
- (15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, *Toxicol. Letters*, 146: 111-120.
- (16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol. Letters*, 180: 213-221.
- (17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 196: 58-67.
- (18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. *Chemosphere*, 34: 835-848.
- (19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, *Mol Pharmacol* 47(6):1197-1203.

Tillägg 1

DEFINITIONER OCH FÖRKORTNINGAR

10-procentsregeln: Möjlighet att från analyserna utesluta datapunkter där replikatens medelvärde för procent specifikt bunden [^3H]-17 β -estradiol är 10 % eller mer över det observerade medelvärdet vid en lägre koncentration (se tillägg 4).

Acceptanskriterier: Minimistandarder för experimentets prestanda avseende kontroller och referensstandarder. Alla acceptanskriterier ska uppfyllas för att ett experiment ska anses vara giltigt.

Exakthet (konkordans): Ett mått på hur väl testresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Det är en relevansaspekt och ett mått på testets prestanda. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med ett test (1).

CF: The OECD Conceptual Framework for the Testing and Evaluation of Endocrine Disrupters (OECD:s begreppsram för provning och bedömning av hormonstörande ämnen).

Kemikalie: Ett ämne eller en blandning.

CV: Variationskoefficient (Coefficient of Variation).

E2: 17 β -estradiol.

ED: Hormonell störning (Endocrine Disruption).

hER α : Human östrogenreceptor alfa.

ER: Östrogenreceptor.

Östrogen aktivitet: Kapaciteten hos en kemikalie att imitera 17 β -estradiols förmåga att binda östrogenreceptorer. Bindning till hER α kan undersökas med denna testmetod.

IC₅₀: Halva maximalt effektiva koncentrationen för en inhiberande testkemikalie.

ICCVAM: The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (i Förenta staterna).

Reproducerbarhet mellan laboratorier: Ett mått på i hur stor utsträckning olika kvalificerade laboratorier kan producera kvalitativt och kvantitativt liknande resultat, med användning av samma protokoll och samma testämnen. Reproducerbarheten mellan laboratorier fastställs under förvalideringen och valideringen och indikerar i hur stor utsträckning ett test framgångsrikt kan överföras mellan laboratorier, även kallat inter-laborativ reproducerbarhet (1).

Reproducerbarhet inom laboratoriet: Ett mått på i vilken utsträckning kvalificerade personer inom samma laboratorium framgångsrikt kan upprepa resultat vid olika tidpunkter när de använder ett visst protokoll. Kallas även intra-laborativ reproducerbarhet (1).

LEC: Lägsta effektiva koncentration (Lowest Effective Concentration) är den lägsta koncentration av testkemikalie som ger en respons (dvs. den lägsta koncentration av testkemikalie vid vilken induktionen statistiskt skiljer sig från parallell vehikelkontroll).

Me too-test: Ett vardagligt uttryck för ett test som strukturellt och funktionellt liknar en validerad och godtagen referenstestmetod. Kallas även 'liknande testmetod'.

PBTG: Prestandabaserad testriktlinje (Performance-Based Test Guideline)

Prestandastandarder: Standarder som baseras på en validerad testmetod och som utgör grunden för utvärdering av jämförbarheten hos ett föreslaget, mekanistiskt och funktionellt likartat test. Här ingår 1) viktiga testdelar, 2) en minimiförteckning med referenskemikalier som valts ut från de kemikalier som har använts för att påvisa att den validerade testmetoden fungerar tillfredsställande och 3) de jämförbara nivåer av exakthet och tillförlitlighet, på grundval av vad som erhållits för den validerade testmetoden, som man bör kunna påvisa för det föreslagna testet när det utvärderas med användning av minimiförteckningen med referenskemikalier (1).

Kvalifikationsämnen: En undergrupp av referensämnen som ingår i prestandastandarderna som kan användas av laboratorier för att påvisa teknisk färdighet med en standardiserad testmetod. Bland urvalskriterierna för dessa ämnen ingår oftast att de representerar responsintervallet, är kommersiellt tillgängliga och att referensdata av hög kvalitet finns tillgängliga.

Färdighet: Påvisad förmåga att korrekt genomföra ett test, innan okända ämnen testas.

Referensöstrogen: 17 β -estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referenstestmetod: De tester som PBTG 493 baserar sig på.

RBA: Relativ bindingsaffinitet. Ett ämnes RBA beräknas som andelen i procent av ämnets log(IC₅₀)-värde i förhållande till 17 β -estradiols log(IC₅₀)-värde.

Relevans: Beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida detta förhållande är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl man genom testet korrekt kan mäta och prediktera den aktuella biologiska effekten. Relevans omfattar också överväganden om exaktheten hos ett test (konkordans) (1).

Tillförlitlighet: Mått på i vilken utsträckning ett test kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tid, när den utförs enligt samma protokoll. Den bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier.

SD: Standardavvikelse (Standard Deviation).

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

Validerad testmetod: Ett test för vilket valideringsstudier har genomförts för att fastställa relevans (inbegripet exakthet) och tillförlitlighet för ett specifikt ändamål. Det är viktigt att notera att en validerad testmetod kanske inte är tillräckligt exakt och tillförlitlig när det gäller ett visst föreslaget ändamål (1).

Validering: Processen enligt vilken pålitlighet och relevans för en särskild strategi, metod, ett

särskilt test, en särskild process eller bedömning etableras för ett fastställt syfte (1).

Tillägg 2

FREYBERGER-WILSONS *IN VITRO*-TESTER AV MÄTTNAD HOS RESPEKTIVE KOMPETITIV BINDNING TILL ÖSTROGENRECEPTOR (ER α) MED REKOMBINANT FULLÄNGDS-ER α

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR (SE ÄVEN ALLMÄN INLEDNING)

1. I detta *in vitro*-test av mättnad hos och kompetitiv bindning till östrogenreceptor (ER α) används human fullängds-ER α -receptor (hrER α) som produceras i, och utvinns från, bakulovirusinfekterade insektceller. Protokollet, som utvecklades av Freyberger och Wilson, prövades i en internationell valideringsstudie som involverade flera laboratorier (2) och vilken visade dess relevans och pålitlighet för det avsedda syftet.
2. Detta test är ett screeningförfarande för att identifiera ämnen som kan binda till fullängds-hrER α . Det används för att fastställa en testkemikalies förmåga att konkurrera med 17 β -estradiol om att binda till hrER α . Kvantitativa testresultat kan omfatta IC₅₀ (ett mått på den koncentration av testkemikalie som behövs för att tränga bort hälften av [³H]-17 β -estradiolen från hrER α) och testkemikaliernas relativa bindningsaffiniteter för hrER α , jämförda med den hos 17 β -estradiol. För kemisk screening kan godtagbara kvalitativa testresultat omfatta klassificeringar av testkemikalier som antingen hrER α -bindare, icke-bindare eller tvetydiga, utifrån de kriterier som beskrivits för bindningskurvorna.
3. Testet använder en radioaktiv ligand, vilket kräver att laboratoriet har licens för att hantera radioaktiva material. Allt handhavande av radioisotoper och farliga kemikalier ska följa de regelverk och rutiner som föreskrivs av nationell lagstiftning.
4. Läs ”ALLMÄN INLEDNING” och ”hrER-BINDNINGSTESTETS DELAR” innan testet används för tillsynsändamål. Definitioner och förkortningar som används i denna testriktlinje beskrivs i tillägg 1.

TESTETS PRINCIP (SE ÄVEN ALLMÄN INLEDNING)

5. Bindningstestet med hrER α mäter förmågan hos radioaktivt inmärkt ligand ([³H]-17 β -estradiol) att binda till ER i närvaron av ökande koncentrationer av testkemikalie (dvs. konkurrerande ligand). Testkemikalier med hög affinitet för ER konkurrerar med den radioaktivt inmärkta liganden vid en lägre koncentration än de kemikalier som har lägre affinitet för receptorn.
6. Detta test består av två huvuddelar: ett mättnadsbindningsexperiment för att karakterisera receptor–ligandinteraktionsparametrar, följt av ett kompetitivt bindningsexperiment som karakteriserar konkurrensen mellan en testkemikalie och en radioaktivt inmärkt ligand vid inbindning till ER.

7. Mättnadsbindningsexperimentets syfte är att inför det kompetitiva bindningsexperimentet karakterisera en receptorsats med avseende på bindningsaffinitet och antal receptorer. Mättnadsbindningsexperimentet mäter, vid jämviktsförhållanden och en fast receptorkoncentration, östrogenreceptors affinitet för dess naturliga ligand (mätt som dissociationskonstant, K_d) och koncentrationen av aktiva bindningsplatser (B_{max}).
8. Det kompetitiva bindningsexperimentet mäter benägenheten hos ett ämne att konkurrera med [^3H]-17 β -estradiol om att binda till ER. Affiniteten kvantifieras genom koncentrationen av testkemikalie som, vid jämvikt, hämmar 50 % av den specifika bindningen av [^3H]-17 β -estradiol (kallad hämmande koncentration 50 %, eller IC_{50}). Detta kan också utvärderas med hjälp av den relativa bindningsaffiniteten (RBA, affiniteten jämförd med IC_{50} för estradiol som mäts separat i samma testomgång). Det kompetitiva bindningsexperimentet mäter bindningen av [^3H]-17 β -estradiol vid en fast koncentration i närvaron av ett stort intervall (åtta tiopotenser) av testkemikaliekoncentrationer. Data anpassas sedan, där så är möjligt, till en form av Hill-ekvationen (Hill, 1910) som beskriver bortträngningen av den radioaktivt märkta liganden av en kompetitiv bindare som binder till en bindningsplats. Den utsträckning i vilken den radioaktivt inmärkta estradiolen trängs bort vid jämvikt används för att karakterisera testkemikalien som en bindare, en icke-bindare eller med tvetydig respons.

FÖRFARANDE

Fastställande av acceptabel proteinfunktion hos hrER α

9. Innan rutinmässiga tester av mättnad och kompetitiv bindning genomförs ska varje ny sats av hrER α visas fungera korrekt i det laboratorium där den ska användas. En tvåstegsproceduren bör användas för att kontrollera prestanda. Dessa steg är som följer:
 - Utför ett mättnadsbindningstest med [^3H]-17 β -estradiol för att fastställa specificitet och mättnad hos hrER α . Icke-linjär regressionsanalys av dessa data (t.ex. BioSoft, McPherson, 1985, Motulsky, 1995) och påföljande Scatchard-diagram ska dokumentera [^3H]-17 β -estradiolens bindningsaffinitet för hrER α (K_d) samt antalet receptorer (B_{max}) för varje sats av hrER α .
 - Genomför ett kompetitivt bindningstest med hjälp av kontrollämnen (referensöstroger, 17 β -estradiol), en svag bindare (t.ex. noretynodrel eller noretindron) och en icke-bindare (oktyltriethoxisilan, OTES). Varje laboratorium ska upprätta en historisk databas för att dokumentera överensstämmelsen hos IC_{50} och andra relevanta värden för referensöstroget och svaga bindare, mellan olika experiment och olika hrER α -satser. Parametrarna för kontrollämnens kurvor över kompetitiv bindning ska vara inom gränserna för 95-procentigt konfidensintervall (se tabell 1), vilka har tagits fram med data från laboratorier som deltog i valideringsstudien för detta test (2).

Tabell 1: Prestandakriterier framtagna för referensöstrogen och svag bindare, FW-hrER-bindningstest.

Ämne	Parameter	Medelvärde ^a	Standard- avvikelse (n)	95 % konfidensintervall ^b	
				Nedre gräns	Övre gräns
17β-estradiol.	Topp (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Botten (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hill-koefficient (Hill slope)	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	Log(IC ₅₀) (M)	-8,92 ^c	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Noretynodrel	Topp (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Botten (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hill-koefficient (Hill slope)	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log(IC ₅₀) (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretindron^c	Topp (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Botten (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hill-koefficient (Hill slope)	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	Log(IC ₅₀) (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

^a Medelvärde (n) $\pm$ standardavvikelse (Standard Deviation, SD) beräknades genom skattning av kurvanpassningsparametrar (fyraparameters Hill-ekvation) för kontrollomgångar som utförts av fyra laboratorier under valideringsstudien (se bilaga N i referens 2).

^b Gränserna för 95-procentigt konfidensintervall anges som en vägledning för acceptanskriterier.

^c Test av noretindron var valfritt för deluppgift 4 under valideringsstudien (se referens 2, deluppgift 4). Således beräknades medelvärdet $\pm$ SD (n) med hjälp av skattade kurvanpassningar (fyraparameters Hill-ekvation) för kontrollomgångar, utförda av två laboratorier.

Intervallet för IC₅₀ kommer att vara beroende av receptorberedningens K_d och koncentrationen av radioaktivt inmärkt ligand som används vid de olika laboratorierna. Lämplig justering för IC₅₀-intervallet, baserad på de betingelser som används för att genomföra testet, kommer att kunna godtas.

Uppvisande av laboratoriets färdighet

10. Se punkterna 17 och 18 och tabell 2 i ”**hrER-BINDNINGSTESTETS DELAR**” i denna testmetod. Varje test (mättnad och kompetitiv bindning) ska bestå av tre oberoende testomgångar (dvs. med nya spädningar av receptor, kemikalier och reagens) på olika dagar och varje omgång ska innehålla tre replikat.

Bestämning av hrER α -koncentration

11. Koncentrationen av aktiv receptor varierar något mellan satser och med förvaringsförhållanden. Därför ska koncentrationen av aktiv receptor som erhållits från leverantören fastställas. Detta ger tillämplig koncentration av aktiv receptor när testomgången ska göras.
12. Under förhållanden som motsvarar kompetitiv bindning (dvs. 1 nM [³H]-estradiol), ska nominella koncentrationer om 0,25, 0,5, 0,75, respektive 1 nM receptor inkuberas i frånvaro

(total bindning) och närvaro (icke-specifik bindning) av 1 μM ej inmärkt estradiol. Specifik bindning, beräknad som differensen av total och icke-specifik bindning, ritas i ett diagram mot den nominella receptorkoncentrationen. Den receptorkoncentration som ger specifika bindningsvärden motsvarande 20 % av tillsatt radioaktivt inmärkt ligand relateras till motsvarande nominella receptorkoncentration, och denna ska användas vid tester av mättnad och kompetitiv bindning. Ofta överensstämmer en slutlig hrER-koncentration på 0,5 nM med detta förhållande.

13. Om 20-procentskriteriet vid upprepade försök inte kan uppfyllas ska experimentets uppställning kontrolleras för möjliga fel. Svårigheter att uppnå 20-procentskriteriet kan indikera att det finns väldigt lite aktiv receptor i satsen av rekombinant receptor och man bör då överväga att använda en annan sats.

Mättnadstest

14. Åtta ökande koncentrationer av [^3H]-17 β -estradiol ska utvärderas i tripletter, enligt följande tre betingelser (se tabell 2):
 - I frånvaron av ej inmärkt 17 β -estradiol och närvaro av ER. Här fastställs total bindning genom att mäta radioaktiviteten i de brunnar som enbart innehåller [^3H]-17 β -estradiol.
 - I närvaron av 1 000 gångers koncentrationsöverskott av ej inmärkt 17 β -estradiol över inmärkt 17 β -estradiol och närvaro av ER. Avsikten med denna betingelse är att mätta de aktiva bindningsplatserna med ej inmärkt 17 β -estradiol och, genom att mäta radioaktiviteten i brunnarna, fastställa den icke-specifika bindningen. Eventuellt kvarvarande radioaktiv estradiol som kan binda till receptorn anses binda till en icke-specifik bindningsplats eftersom den tillsatta icke-radioaktiva estradiolen ska ha så hög koncentration att den har bundit till alla specifika bindningsplatser på receptorn.
 - I frånvaro av ej inmärkt 17 β -estradiol och frånvaro av ER (fastställande av total radioaktivitet).

Beredning av lösningar med [^3H]-17 β -estradiol respektive ej inmärkt 17 β -estradiol

15. Spädningar av [^3H]-17 β -estradiol ska beredas genom att tillsätta testbuffert till en 12 nM stamlösning av [^3H]-17 β -estradiol för att få koncentrationer som initialt sträcker sig från 0,12 nM till 12 nM. Genom att tillsätta 40 μl av dessa lösningar till respektive testbrunnar i en 96-hålsmikrotiterplatta (till en slutvolym på 160 μl) erhålls slutliga testkoncentrationer på 0,03–3,0 nM. Beredning av testbuffert, stamlösning med [^3H]-17 β -estradiol samt spädningar och fastställande av koncentrationer beskrivs i detalj i FW-protokollet (2).
16. Spädningar av etanolinnehållande 17 β -estradiollösningar ska beredas genom att tillsätta testbuffert och på så sätt erhålla åtta ökande koncentrationer, initialt från 0,06 μM till 6 μM . Genom att tillsätta 80 μl av dessa lösningar till respektive testbrunn i en 96-hålsmikrotiterplatta (till en slutvolym på 160 μl) erhålls slutliga testkoncentrationer på 0,03–3 μM . Slutkoncentrationen av ej inmärkt 17 β -estradiol i de olika icke-specifika bindningstestbrunnarna bör vara 1 000 gånger högre än koncentrationen av [^3H]-17 β -

estradiol. Beredning av spädningar av ej inmärkt 17 β -estradiol beskrivs i detalj i FW-protokollet (2).

17. Den nominella receptorkoncentration som ger specifik bindning av $20 \pm 5 \%$ bör användas (se punkterna 12–13). Lösningen med hrER α ska beredas omedelbart före användning.

18. Förbered 96-hålmikrotiterplattorna enligt schema i tabell 2, med tre replikat per koncentration. Exempel på fördelning över plattan av koncentrationer och volymer av [^3H]-17 β -estradiol, ej inmärkt 17 β -estradiol, buffert och receptor ges i tillägg 2.2.

Tabell 2: Upplägg för mikrotiterplatta till mättnadsbindningstest

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>	
<i>A</i>	0,03 nM [³ H]E2 + ER			0,06 nM [³ H]E2 + ER			0,08 nM [³ H]E2 + ER			0,10 nM [³ H]E2 + ER			Total binding (lösnings medel)
<i>B</i>	0,30 nM [³ H]E2 + ER			0,60 nM [³ H]E2 + ER			1,0 nM [³ H]E2 + ER			3,0 nM [³ H]E2 + ER			
<i>C</i>													
<i>D</i>	0,03 nM [³ H]E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [³ H]E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [³ H]E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [³ H]E2 + ER + 0,10 μM E2			Icke- specifik binding
<i>E</i>	0,30 nM [³ H]E2 + ER + 0,30 μ			0,60 nM [³ H]E2 + ER + 0,60 μ			1,0 nM [³ H]E2 + ER + 1,0 μM E2			3,0 nM [³ H]E2 + ER + 3,0 μM E2			
<i>F</i>													
<i>G</i>													
<i>H</i>													

[^3H]E2: [^3H]-17 β -estradiol.

ER: östrogenreceptor.

E2: ej inmärkt 17 β -estradiol.

19. Testmikrotiterplattor bör inkuberas på horisontellt cirkulerande skak vid 2–8 °C i 16–20 timmar.

Mätning av [^3H]-17 β -Estradiol bunden till hrER α

20. Den [^3H]-17 β -estradiol som är bunden till hrER α ska separeras från fri [^3H]-17 β -estradiol genom tillsats av 80 μl kall DCC-suspension till varje brunn, plattorna skakas sedan i 10 minuter och centrifugeras i 10 minuter med ungefär 2 500 varv per minut. För att minimera dissociationen av den bundna [^3H]-17 β -estradiolen från hrER α under denna procedur är det extremt viktigt att buffertarna och testbrunnarna håller en temperatur mellan 2 och 8 °C och att varje steg utförs snabbt. En skakapparat för mikrotiterplattor är nödvändig för snabb och effektiv hantering av plattorna.

21. Sedan tas 50 µl supernatant innehållande den hrERα-bundna [³H]-17β-estradiolen, men extremt försiktigt så att man inte råkar förorena brunnarna genom att vidröra DCC, och placeras i en andra mikrotiterplatta.
22. Sedan tillsätts 200 µl scintillationsvätska, som kan omvandla den nukleära strålningens rörelseenergi till ljus, till varje brunn (A1–B12 och D1–E12). Brunnarna G1–H12 (kvantifieras i totala dpm) utgör en seriespädning av [³H]-17β-estradiol (40 µl) som ska överföras direkt till scintillationsvätskan i mätplattans brunnar enligt tabell 3, dvs. dessa brunnar innehåller endast 200 µl scintillationsvätska och korrekt spädning av [³H]-17β-estradiol. Dessa mätningar visar, i dpm, hur mycket [³H]-17β-estradiol som tillsattes till varje uppsättning brunnar för total bindning och icke-specifik bindning.

Tabell 3: Upplägg av mikrotiterplatta vid mättnadsbindningstest, mätning av radioaktivitet

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [³ H]E2 + ER			0,06 nM [³ H]E2 + ER			0,08 nM [³ H]E2 + ER			0,10 nM [³ H]E2 + ER			Total bindning (lösningsmedel)
B	0,30 nM [³ H]E2 + ER			0,60 nM [³ H]E2 + ER			1,0 nM [³ H]E2 + ER			3,0 nM [³ H]E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [³ H]E2 + ER + 0,03 µM E2			0,06 nM [³ H]E2 + ER + 0,06 µM E2			0,08 nM [³ H]E2 + ER + 0,08 µM E2			0,10 nM [³ H]E2 + ER + 0,10 µM E2			Icke-specifik bindning
E	0,30 nM [³ H]E2 + ER + 0,30 µM			0,60 nM [³ H]E2 + ER + 0,60 µM			1,0 nM [³ H]E2 + ER + 1,0 µM E2			3,0 nM [³ H]E2 + ER			
F													
G	0,03 nM [³ H]E2 (totala dpm)			0,06 nM [³ H]E2			0,08 nM [³ H]E2			0,10 nM [³ H]E2			Totala dpm*
H	0,30 nM [³ H]E2			0,60 nM [³ H]E2			1,0 nM [³ H]E2			3,0 nM [³ H]E2			

[³H]E2: [³H]-17β-estradiol.

ER: östrogenreceptor.

E2: ej inmärkt 17β-estradiol.

dpm: sönderfall per minut (disintegrations per minute).

* Seriespädningarna av [³H]-inmärkt estradiol bör tillsättas direkt till 200 µl scintillationsvätska i brunnar G1–H12.

23. Mätningarna ska starta med en fördröjning om minst 2 timmar och varje brunn ska mätas i 40 minuter. En scintillationsräknare för mikrotiterplattor bör användas för att fastställa dpm/brunn med korrigering för quenching. Om en scintillationsräknare för mikrotiterplattor inte finns att tillgå kan proverna mätas i en traditionell räknare. Under sådan förhållanden kan man överväga en kortare mättid.

Kompetitivt bindningstest

24. Det kompetitiva bindningstestet mäter bindningen av [^3H]-17 β -estradiol vid en viss koncentration i närvaro av ökande koncentration av testkemikalie. Tre parallella replikat bör användas för varje koncentration i varje testomgång. Dessutom bör tre icke-parallella testomgångar utföras för varje testad kemikalie. Testet bör utföras i en eller flera 96-hålsmikrotiterplattor.

Kontroller

25. Varje experiment ska inkludera parallella lösningsmedelprover och kontroller (dvs. referensöstroger, svag bindare och icke-bindare). Fullständiga koncentrationskurvor för östrogerreferens och kontroller (dvs. svag bindare resp. icke-bindare) ska placeras i en platta vid varje testomgång. Alla andra plattor ska innehålla: i) en hög (maximal bortträngning) respektive medelhög (ungefär IC_{50}) koncentration av E2 respektive svag bindare i tripletter, ii) lösningsmedelskontroll och icke-specifik bindning, båda som tripletter. Förfaranden för beredning av testbuffert, kontroller [^3H]-17 β -estradiol, hrER α och testkemikalielösningar beskrivs i referens 2 (bilaga K, se FW Assay Protocol).

Lösningsmedelskontroll

26. Lösningsmedelskontrollen indikerar att lösningsmedlet inte interagerar med testsystemet och mäter också total bindning (TB). Etanol är det mest lämpliga lösningsmedlet. Men om testkemikaliens högsta koncentration inte är löslig i etanol kan DMSO användas. Koncentrationen av etanol, eller DMSO om det används, blir 1,5 % i det slutliga testbrunnarna och får inte överstiga 2 %.

Buffertkontroll

27. Buffertkontrollen (BC) ska inte innehålla vare sig lösningsmedel eller testkemikalie men testets alla övriga ingående delar. Resultaten för buffertkontrollen jämförs med lösningsmedelskontrollen för att säkerställa att det valda lösningsmedlet inte påverkar testsystemet.

Stark bindare (referensöstroger)

28. Den endogena liganden är 17 β -estradiol (CAS-nr 50-28-2) och den binder med hög affinitet till alfa-subtypen av ER. En standardkurva med ej inmärkt 17 β -estradiol ska upprättas för varje kompetitivt hrER α -bindningstest, för att möjliggöra en bedömning av variationen när testet, över tid, upprepas i samma laboratorium. Åtta lösningar av ej inmärkt 17 β -estradiol ska beredas i etanol, med koncentrationer i testbrunnarna som sträcker sig från 100 nM–10 pM (–7[logM] till –11[logM]), med följande spridning (–7[logM], –8[logM], –8,5[logM], –9[logM], –9,5[logM], –10[logM], –11[logM]). Den högsta koncentrationen av ej inmärkt 17 β -estradiol (1 μM) indikerar också icke-specifik bindning. Denna koncentration markeras med märkningen ”NSB” i tabell 4 även om den också är en del av standardkurvan.

Svag bindare

29. En svag bindare (noretynodrel [CAS-nr 68-23-5] eller noretindron [CAS-nr 68-22-4]) bör inkluderas för att påvisa varje experiments känslighet och möjliggöra en bedömning av

variation när testet används längre perioder. Åtta lösningar av den svaga bindaren ska beredas i etanol, med koncentrationer i testbrunnarna som sträcker sig från 3 nM till 30 µM ($-8,5[\log M]$ till $-4,5[\log M]$), med följande spridning: $-4,5[\log M]$, $-5[\log M]$, $-5,5[\log M]$, $-6[\log M]$, $-6,5[\log M]$, $-7[\log M]$, $-7,5[\log M]$, $-8,5[\log M]$.

Icke-bindare

30. Oktyltriethoxisilan (OTES, CAS-nr 2943-75-1) ska användas som negativ kontroll (icke-bindare). Den ger återkoppling om att testet, så som det utförs, detekterar när testkemikalier inte binder till hrERα. Åtta lösningar av icke-bindaren ska beredas i etanol, med koncentrationer som i testbrunnarna sträcker sig, i tiopotenssteg, från 0,1 nM–1 000 µM ($-10[\log M]$ till $-3[\log M]$). Di-*n*-butylftalat (DBP) kan användas som en alternativ icke-bindare-kontroll. Dess maximala löslighet har visats vara $-4[\log M]$.

hrERα-koncentration

31. Den mängd receptor som ger en specifik bindning på $20 \pm 5 \%$ av 1 nM radioaktivt märkt ligand bör användas (se punkterna 12–13 i tillägg 2). Lösningen med hrERα ska beredas omedelbart före användning.

[³H]-17β-estradiol

32. Koncentrationen för [³H]-17β-estradiol i testbrunnarna bör vara 1,0 nM.

Testkemikalier

33. Vid det första tillfället är det nödvändigt att genomföra ett löslighetstest för att fastställa löslighetsgränsen för varje testkemikalie och för att identifiera lämpligt koncentrationsintervall att använda sig av under testet. Samtliga testkemikaliers respektive löslighetsgräns i lösningsmedlet ska fastställas initialt och vidare bekräftas under testbetingelser. Den slutkoncentration som används i testet ska inte överstiga 1 mM. Intervallsökningen görs med en lösningsmedelskontroll och åtta logaritmiska seriespädningar, där man börjar med maximal acceptabel koncentration (t.ex. 1 mM eller lägre, baserat på löslighetsgräns), och närvaron av grumlighet eller fällning (se också punkt 35). Testkemikalien ska testas med 8 koncentrationskurvor med logaritmisk spridning utifrån fynden i det föregående intervallsökningstestet. Koncentrationer i det andra och tredje experimenten bör anpassas för en bättre karakterisering av koncentration–responskurvan.
34. Spädningar av testkemikalien ska beredas i lämpligt lösningsmedel (se punkt 26 i tillägg 2). Om testkemikalien inte är lös i vare sig etanol eller DMSO, och en tillsats av mer lösningsmedel skulle göra att koncentrationen av lösningsmedel i det slutliga provröret överskred den godtagbara gränsen, kan den högsta koncentrationen sänkas till nästa lägre koncentration. I sådana fall kan ytterligare en koncentration läggas till i den lägre änden av koncentrationsserien. Övriga koncentrationer i serien bör förbli oförändrade.
35. Testkemikalielösningarna ska iakttas noggrant vid tillsatsen till testbrunnen, eftersom testkemikalien kan falla ut i detta steg. Data för alla brunnar som innehåller en fällning ska uteslutas från kurvanpassning och anledningen till uteslutningen av data noteras.

36. Om det sedan tidigare från andra källor finns information som tillhandahåller ett $\log(IC_{50})$ -värde för en testkemikalie, kan det vara lämpligt att geometriskt sprida spädningarna (dvs. 0,5 log-enheter runt det förväntade $\log[IC_{50}]$ -värdet). Slutresultatet bör återspegla tillräcklig spridning av koncentrationer på båda sidor av $\log(IC_{50})$ -värdet, inklusive ”topp” och ”botten”, så att bindningskurvan kan karakteriseras tillfredsställande.

Organisering av testplattor

37. Märkta mikrotiterplattor ska beredas för sexfaldiga inkubationer med koder för lösningsmedelskontrollen, den högsta koncentrationen av referensöstrogeen som också tjänar som indikator på icke-specifik bindning (NSB), och buffertkontrollen, samt för inkubation i tripletter med koder för var och en av de åtta koncentrationerna för icke-bindande kontroll (oktyltriotoxisilan), de sju lägre koncentrationerna av referensöstrogeen, de åtta koncentrationsnivåerna för svag bindare och de åtta koncentrationerna av varje testkemikalie (TC). Ett exempel på upplägget av plattschemat för fullständiga koncentrationskurvor för referensöstrogeen och kontroll ges nedan i tabell 4. Ytterligare mikrotiterplattor används för testkemikalierna och ska inkludera plattkontroller, det vill säga 1) en hög koncentration (maximal bortträngning) och en mellankoncentration (ungefär IC_{50}) av vardera E2 och svag bindare i tripletter, 2) lösningsmedelskontroll och icke-specifik bindning, båda sexfalt (tabell 5). Ett exempel på plattupplägg för ett kompetitivt test med tre okända testkemikalier ges i tillägg 2.3. De koncentrationer som anges i tabellerna 4 och 5 är testets slutkoncentrationer. Maximal koncentration för E2 ska vara 1×10^{-7} M och för den svaga bindaren bör den högsta koncentrationen som används för den svaga bindaren på platta 1 användas. Laboratoriet ska fastställa IC_{50} med hjälp av sin historiska kontrolldatabas. Detta värde kan förväntas vara jämförbart med det som iakttagits i valideringsstudierna (se tabell 1).

Tabell 4: Upplägg för mikrotiterplatta till kompetitivt bindningstest, fullständiga koncentrationskurvor för referensöstrogeen och kontroller (platta 1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (endast lösningsmedel)			TB (endast lösningsmedel)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1 \times 10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Blankprov*		
D	NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1 \times 10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1 \times 10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1 \times 10^{-7,5}$)			NE ($1 \times 10^{-8,5}$)		
F	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
G	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Blankprov (radioaktivitet)**			Blankprov (radioaktivitet)**			Buffertkontroll			Buffertkontroll		

I detta exempel är den svaga bindaren noretinodrel (NE).

* Faktiskt blankprov, brunnen används inte.

** Blankprov ej använt under inkubationen, men till för att bekräfta total tillsatt mängd radioaktivitet.

Tabell 5: Upplägg för mikrotiterplatta till kompetitivt bindningstest, fullständiga koncentrationskurvor för testkemikalier och plattkontroller.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (endast lösningsmedel)			TB (endast lösningsmedel)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
C	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
D	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
E	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
F	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
G	TC3 (1×10^{-7})			TC3 (1×10^{-8})			TC3 (1×10^{-9})			TC3 (1×10^{-10})		
H	NE (IC ₅₀)			NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			E2 (IC ₅₀)			E2 (1×10^{-7})		

I detta exempel är den svaga bindaren noretinodrel (NE).

Slutförande av kompetitivt bindningstest

38. Som visas i tabell 6, ska 80 µl av lösningsmedelskontrollen, buffertkontrollen, östrogenreferensen, den svaga bindaren, icke-bindaren och testkemikalierna som har beretts i testbuffert tillsättas till brunnarna. Sedan ska 40 µl av en 4 nM [³H]-17β-estradiollösning tillsättas till varje brunn. Efter mild rotation i 10–15 minuter vid 2–8 °C, ska 40 µl hrERα-lösning tillsättas. Testmikrotiterplattor bör inkuberas på roterande skak vid 2–8 °C i 16–20 timmar.

Tabell 6: Tillsatsvolym av beståndsdelar till kompetitivt bindningstest för hrER, i mikrotiterplattor

Volym (µl)	Beståndsdel
80	Ej inmärkt 17β-estradiol, noretynodrel, OTES, testkemikalier, lösningsmedel eller buffert
40	4 nM [³ H]-17β-estradiollösning
40	hrERα-lösning, enligt fastställd koncentration
160	Total volym i varje testbrunn

39. Kvantifieringen av [³H]-17β-estradiol bundet till hrERα, efter separation av [³H]-17β-estradiol bundet till hrERα från fritt [³H]-17β-estradiol genom tillsats av 80 µl av kall DCC-suspension till varje brunn, bör sedan utföras enligt instruktioner för mättnadsbindningstestet, i punkterna 20–23.

40. Brunnarna H1–6 (identifierade som blankprov [radioaktivitet] i tabell 4) anger dpm för [³H]-inmärkt estradiol i 40 µl. Dosen om 40 µl bör överföras direkt till scintillationsvätskan i brunnarna H1–H6.

Acceptanskriterier

Mättnadsbindningstest

41. Den specifika bindningskurvan bör nå en platå med ökande koncentrationer av [³H]-17β-estradiol, indikerande mättnad av hrERα med ligand.
42. Den specifika bindningen vid 1 nM av [³H]-17β-estradiol bör vara inom acceptansintervallet 15–25 % för genomsnittet av uppmätt total tillsatt radioaktivitet från de olika testomgångarna. Enstaka mindre avvikelser utanför detta intervall kan godtas, men om testomgångar konsekvent faller utanför intervallet eller om en viss omgång signifikant faller utanför intervallet bör proteinkoncentrationen justeras och mättnadstestet upprepas.
43. Data bör bilda ett linjärt Scatchard-diagram.
44. Den icke-specifika bindningen bör inte vara överdrivet stor. Storleken på den icke-specifika bindningen bör normalt vara < 35 % av den totala bindningen. Men kvoten kan emellanåt överskrida denna gräns vid mätningar av mycket låga dpm-tal för den lägsta koncentrationen av testad radioaktivt inmärkt 17β-estradiol.

Kompetitiv bindningstest

45. Ökande koncentrationer av ej inmärkt 17β-estradiol bör tränga bort [³H]-17β-estradiol från receptorn på ett sätt som överensstämmer med kompetitiv bindning till en bindningsplats.
46. Den hämmande koncentrationen, IC₅₀, för referensöstroget (dvs. 17β-estradiol) bör ungefär motsvara den molära koncentrationen för [³H]-17β-estradiol plus K_d-värdet, som fastställts vid mättnadsbindningstestet.
47. Den totala specifika bindningen bör genomgående hamna inom acceptansintervallet på 20 ± 5 % när den genomsnittliga uppmätta totala radioaktiva koncentrationen, som har tillsatts till varje brunn, har varit 1 nM vid flera testomgångar. Enstaka mindre avvikelser utanför detta intervall kan godtas, men om testomgångar konsekvent faller utanför intervallet eller om en viss omgång signifikant hamnar utanför intervallet bör proteinkoncentrationen justeras.
48. Lösningssmedlet bör inte påverka vare sig testets känslighet eller reproducerbarhet. Resultaten för lösningssmedelskontrollen (TB-brunnar) jämförs med buffertkontrollen för att säkerställa att det valda lösningssmedlet inte påverkar testsystemet. Om lösningssmedlet inte har någon effekt på testet bör resultaten för TB och buffertkontroll vara jämförbara.
49. Icke-bindaren bör inte tränga bort mer än 25 % av [³H]-17β-estradiol från hrERα när den testas upp till 10⁻³ M (OTES) eller 10⁻⁴ M (DBP).

50. Prestandakriterier utarbetades för referensöstrogenet och två svaga bindare (t.ex. noretynodrel, noretindron) med hjälp av data från valideringsstudien av FW-hrER-bindningstestet (bilaga N till referens 2). I valideringsstudien uppges 95-procentiga konfidensintervall för genomsnittet $(n) \pm SD$ för deltagande laboratoriers alla kontrollomgångar. De 95-procentiga konfidensintervallen beräknades för kurvanpassningsparametrarna (dvs. topp, botten, Hill-koefficient [Hill slope], $\log[IC_{50}]$ -värde) för referensöstrogenet och de svaga bindarna, och för $\log_{10}RBA$ -värdet för de svaga bindarna jämförda med referensöstrogenet, och anges som prestandakriterier för de positiva kontrollerna. Tabell 1 anger förväntade intervall för kurvanpassningsparametrarna, vilka kan användas som prestandakriterier. I praktiken kan intervallet för IC_{50} variera något med K_d för receptorberedningen och ligandkoncentrationen.
51. Inga prestandakriterier för testkemikaliernas kurvanpassningsparametrar utarbetades på grund av den stora mängden möjliga testkemikalier och deras variation i möjliga affiniteter och utfall (t.ex. fullständig kurva, delkurva, ingen kurvanpassning). Men yrkesmässigt omdöme ska tillämpas vid granskning av resultaten från en testkemikalies alla testomgångar. Vidare ska man använda ett tillräckligt intervall av testkemikaliekoncentration för att klart kunna beskriva toppen (t.ex. 90–100 % bindning) på den kompetitiva bindningskurvan. Variationen mellan replikat vid varje koncentration av testkemikalie, liksom mellan de tre oberoende testomgångarna, ska vara rimlig och vetenskapligt försvarbar. Kontroller från en testkemikalies alla testomgångar bör hålla sig nära de prestandamätningar som har rapporterats för detta FW-test och överensstämma med historiska kontrolldata från respektive laboratorium.

DATAANALYS

Mättnadsbindningstest

52. Både total och icke-specifik bindning mäts. Från dessa värden beräknas specifik bindning av ökande koncentrationer av $[^3H]$ -17 β -estradiol under jämviktsförhållanden genom att subtrahera icke-specifik från total. Ett diagram över specifik bindning mot $[^3H]$ -17 β -estradiol-koncentration bör nå en plåtå för maximal specifik bindning, vilken indikerar ett hrER α mättat av $[^3H]$ -17 β -estradiol. Dessutom bör dataanalysen klargöra inbindning av $[^3H]$ -17 β -estradiol till en enda bindningsplats med hög affinitet. Icke-specifik, total och specifik bindning bör illustreras med en mättnadsbindningskurva. Vidare analys av dessa data bör använda sig av icke-linjär regressionsanalys (t.ex. BioSoft, McPherson, 1985, Motulsky, 1995) med en slutlig dataredovisning i form av ett Scatchard-diagram.
53. Dataanalysen bör fastställa B_{max} och K_d enbart utifrån totala bindningsdata, med antagandet att den icke-specifika bindningen är linjär, om inte en motivering ges för att använda en annan metod. Dessutom ska robust regression användas i fastställande av bästa anpassning, om inte annat val motiveras. Val av robust regressionsmetod ska anges. Korrigering för liganduttömning (t.ex. med hjälp av Swillens metod 1995) bör alltid användas i fastställande av B_{max} och K_d utifrån mättnadsbindningsdata.

Kompetitiv bindningstest

54. Kurvan över kompetitiv bindning ritas som specifik [^3H]-17 β -estradiol-bindning mot koncentrationen av konkurrerande ligand (log10-enheter). Den koncentration av testkemikalie som hämmar 50 % av den maximala specifika [^3H]-17 β -estradiol-bindningen är IC_{50} -värdet.
55. Uppskattningar av $\log(\text{IC}_{50})$ -värden för de positiva kontrollerna (t.ex. referensöstroge och svag bindare) ska fastställas med hjälp av lämplig programvara för icke-linjär kurvanpassning så att de passar en fyraparameters Hill-ekvation (t.ex. BioSoft, McPherson, 1985, Motulsky, 1995). Kurvans topp, botten, lutning och $\log(\text{IC}_{50})$ -värde ska i allmänhet lämnas utan restriktion (unconstrained) vid anpassning av dessa kurvor. Robust regression ska användas i fastställande av bästa anpassning, om inte annat val motiveras. Ingen korrigering för liganduttömning ska göras. Efter inledande analys ska varje bindningskurva granskas för att säkerställa korrekt anpassning till modellen. Den svaga bindarens relativa bindningsaffinitet (RBA) beräknas som procentuell andel av dess $\log(\text{IC}_{50})$ -värde i förhållande till 17 β -estradiols $\log(\text{IC}_{50})$ -värde. Resultat från de positiva kontrollerna och den icke-bindande kontrollen ska utvärderas genom att använda måtten på testprestanda i punkterna 45–50 i detta tillägg 2.
56. Data för alla testkemikalier ska analyseras med en stegvis strategi för att säkerställa att data analyseras korrekt och att varje kurva för kompetitiv bindning klassificeras korrekt. Det är lämpligt att en testkemikalies alla testomgångar initialt underkastas en standardiserad dataanalys som är identisk med den som använts för referensöstroge och kontroller med svaga bindare (se punkt 55 ovan). När den är klar bör en teknisk granskning av kurvanpassningsparametrarna göras, liksom en visuell granskning av hur väl data stämmer med den genererade kurvan över kompetitiv bindning, för varje testomgång. Under denna tekniska granskning är följande iakttagelser goda indikationer på att testet och dataanalyserna genomförts korrekt: en koncentrationsberoende minskning i procentuell, specifikt bunden [^3H]-17 β -estradiol, låg variation mellan de tekniska replikaten för varje kemisk koncentration och överensstämmelse mellan anpassningsparametrarna från de tre testomgångarna.

Tolkning av data

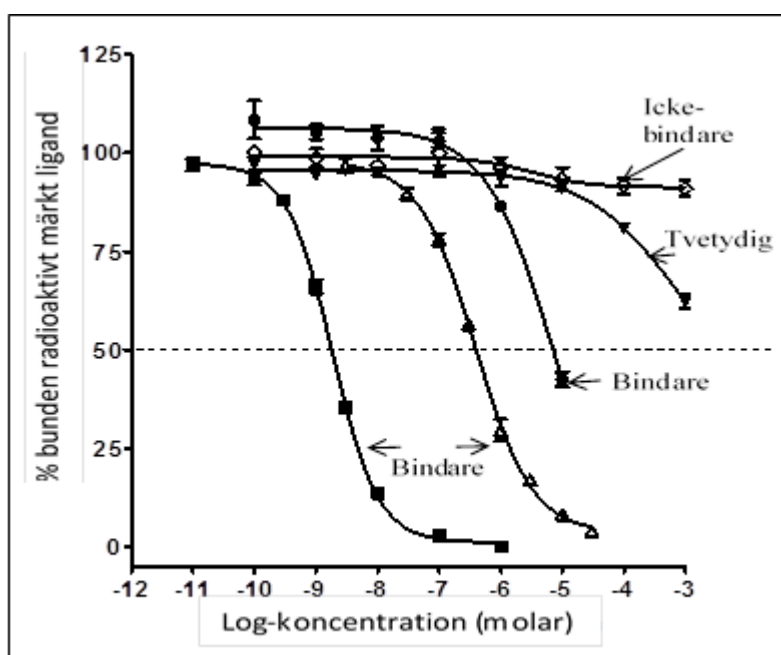
57. Förutsatt att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses en testkemikalie binda till hrER α om data kan anpassas till en bindningskurva och den lägsta punkten på responskurvan, inom dataintervallet, är mindre än 50 % (figur 1).
58. Förutsatt att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda, anses en testkemikalie inte binda till hrER α om
- data kan anpassas till en bindningskurva och den lägsta punkten på responskurvan, inom dataintervallet, är över 75 %, eller
 - data inte kan anpassas till en bindningskurva och den lägsta, outjämnade genomsnittliga procentuella bindningen inom datamängdens koncentrationsgrupper är över 75 %.

59. Testkemikalier anses tvetydiga om inget av villkoren ovan uppfylls (t.ex. den lägsta punkten på den anpassade responskurvan ligger mellan 76 % och 51 %).

Tabell 7: Kriterier för klassificering utifrån en testkemikalies kurva över kompetitiv bindning.

Klassificering	Kriterier
Bindare ^a	Data kan anpassas till en bindningskurva. Den lägsta punkten på responskurvan, inom dataintervallet, är mindre än 50 % .
Icke-bindare ^b	Om data kan anpassas till en bindningskurva och den lägsta punkten på den anpassade responskurvan, inom dataintervallet, är över 75 % . Om data inte kan anpassas till en bindningskurva och den lägsta, outjämnade genomsnittliga procentuella bindningen inom datamängdens koncentrationsgrupper är över 75 % .
Tvetydig ^c	Varje mätbar testomgång som varken är en bindare eller en icke-bindare (t.ex. den lägsta punkten längs den anpassade kurvan ligger mellan 76–51 %).

Figur 1: Exempel på klassificeringar av testkemikalier med hjälp av kurva för kompetitiv bindning.



60. Flera testomgångar genomförda med en viss testkemikalie, i samma laboratorium, kombineras genom att tilldela numeriska värden till varje omgång och ta fram ett medelvärde enligt tabell 8. Resultaten för de kombinerade testomgångarna inom varje laboratorium jämförs med den förväntade klassificeringen för varje testkemikalie.

Tabell 8: Metod för klassificering av testkemikalier med användning av flera testomgångar inom ett

laboratorium

Tilldelning av numeriska värden för enskilda testomgångar:	
Klassificering	Numeriskt värde
Bindare	2
Tvetydig	1
Icke-bindare	0
Klassificering av genomsnittligt numeriskt värde vid flera testomgångar:	
Klassificering	Numeriskt värde
Bindare	$\text{Genomsnitt} \geq 1,5$
Tvetydig	$0,5 \leq \text{genomsnitt} < 1,5$
Icke-bindare	$\text{Genomsnitt} < 0,5$

TESTRAPPORT

61. Se punkt 24 i ”**hrER-BINDNINGSTESTETS DELAR**” i denna testmetod.

Tillägg 2.1

TERMER

[³H]E2: 17β-estradiol radioaktivt inmärkt med tritium.

DCC: Dextran-täckt träkol (Dextran-Coated Charcoal).

E2: Ej inmärkt 17β-estradiol (inert).

Testbuffert: 10 mM tris, 10 mg/ml bovint serumalbumin, 2 mM DTT, 10 % glycerol, 0,2 mM leupeptin, pH 7,5.

hrERα: Human rekombinant östrogenreceptor alfa (ligandbindande domän).

Replikat: En av flera brunnar med samma innehåll och koncentrationer vilka testas parallellt inom en enskild testomgång. I detta protokoll testas varje koncentration av testkemikalie i tripletter, det betyder att tre replikat testas samtidigt vid varje koncentration av testkemikalie.

Testomgång: En fullständig uppsättning av parallellt hanterade brunnar i mikrotiterplattor, vilka ger all nödvändig information för att karakterisera en testkemikalies bindning till hrERα (dvs. totalt [³H]-17β-estradiol tillsatt till testbrunnen, maximal bindning hos [³H]-17β-estradiol till hrERα, icke-specifik bindning och total bindning vid olika koncentrationer av testkemikalie). En testomgång kan bestå av så lite som en testbrunn (dvs. ett replikat) per koncentration, men eftersom protokollet kräver tripletter, består en testomgång av tre testbrunnar per koncentration. Dessutom kräver detta protokoll tre oberoende (dvs. icke-parallella) testomgångar per kemikalie.

Tillägg 2.2

REPRESENTATIVT [³H]-17B-ESTRADIOL-MÄTTNADSTEST MED REPLIKAT I TRE BRUNNAR

Representativt [³ H]-17β-estradiol-mättnadstest med replikat i tre brunnar											
Position	Replikat	Kod för brunnstyp	Initial radioaktiv E2-koncentration (nM)	Radioaktiv E2-volym (μl)	Slutlig radioaktiv E2-koncentration (nM)	Initial icke-radioaktiv E2-koncentration (μM)	Icke-radioaktiv E2-volym (μl)	Slutlig icke-radioaktiv E2-koncentration (μM)	Buffertvolym (μl)	Receptorvolym (μl)	Total volym i brunnarna (μl)
A1	1	H	0,12	40	0,03	–	–	–	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	–	–	–	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	–	–	–	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	–	–	–	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	–	–	–	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	–	–	–	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	–	–	–	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	–	–	–	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	–	–	–	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	–	–	–	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	–	–	–	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	–	–	–	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	–	–	–	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	–	–	–	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	–	–	–	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	–	–	–	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	–	–	–	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	–	–	–	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	–	–	–	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	–	–	–	80	40	160
B9	3	H	4,00	40	1,00	–	–	–	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	–	–	–	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	–	–	–	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	–	–	–	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	–	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	–	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	–	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	–	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	–	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	–	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	–	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	–	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	–	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	–	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	–	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	–	40	160

Representativt [³ H]-17β-estradiol-mättnadstest med replikat i tre brunnar											
Position	Replikat	Kod för brunnstyp	Initial radioaktiv E2-koncentration (nM)	Radioaktiv E2-volym (μl)	Slutlig radioaktiv E2-koncentration (nM)	Initial icke-radioaktiv E2-koncentration (nM)	Icke-radioaktiv E2-volym (μl)	Slutlig icke-radioaktiv E2-koncentration (μM)	Buffertvolym (μl)	Receptorvolym (μl)	Total volym i brunnarna (μl)
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	–	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	–	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	–	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	–	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	–	40	160
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	–	40	160
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	–	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	–	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	–	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	–	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	–	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	–	40	160
G1	1	Radioaktiv	0,12	40	0,03	–	–	–	–	–	40
G2	2	Radioaktiv	0,12	40	0,03	–	–	–	–	–	40
G3	3	Radioaktiv	0,12	40	0,03	–	–	–	–	–	40
G4	1	Radioaktiv	0,24	40	0,06	–	–	–	–	–	40
G5	2	Radioaktiv	0,24	40	0,06	–	–	–	–	–	40
G6	3	Radioaktiv	0,24	40	0,06	–	–	–	–	–	40
G7	1	Radioaktiv	0,32	40	0,08	–	–	–	–	–	40
G8	2	Radioaktiv	0,32	40	0,08	–	–	–	–	–	40
G9	3	Radioaktiv	0,32	40	0,08	–	–	–	–	–	40
G10	1	Radioaktiv	0,40	40	0,10	–	–	–	–	–	40
G11	2	Radioaktiv	0,40	40	0,10	–	–	–	–	–	40
G12	3	Radioaktiv	0,40	40	0,10	–	–	–	–	–	40
H1	1	Radioaktiv	1,20	40	0,30	–	–	–	–	–	40
H2	2	Radioaktiv	1,20	40	0,30	–	–	–	–	–	40
H3	3	Radioaktiv	1,20	40	0,30	–	–	–	–	–	40
H4	1	Radioaktiv	2,40	40	0,60	–	–	–	–	–	40
H5	2	Radioaktiv	2,40	40	0,60	–	–	–	–	–	40
H6	3	Radioaktiv	2,40	40	0,60	–	–	–	–	–	40
H7	1	Radioaktiv	4,00	40	1,00	–	–	–	–	–	40
H8	2	Radioaktiv	4,00	40	1,00	–	–	–	–	–	40
H9	3	Radioaktiv	4,00	40	1,00	–	–	–	–	–	40
H10	1	Radioaktiv	12,00	40	3,00	–	–	–	–	–	40
H11	2	Radioaktiv	12,00	40	3,00	–	–	–	–	–	40
H12	3	Radioaktiv	12,00	40	3,00	–	–	–	–	–	40

Obs: brunnarna som märkts med ”radioaktiv” är tomma under inkubationen. Dessa 40 μl tillsätts endast i scintillationsräkningssyfte.

Tillägg 2.3: Upplägg för brunnar till test av kompetitiv bindning

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentra- tionskod	Medan- koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (μl)	Buffervolym (μl)	spårsubstans (radioaktiv E2)	Volym från spädningsplatta (μl)	Slutvolym (μl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
Fast	A1	1	Total binding	TB	TB1	–	40		40	80	160	–
Fast	A2	2	Total binding	TB	TB2	–	40		40	80	160	–
Fast	A3	3	Total binding	TB	TB3	–	40		40	80	160	–
Fast	A4	1	Total binding	TB	TB4	–	40		40	80	160	–
Fast	A5	2	Total binding	TB	TB5	–	40		40	80	160	–
Fast	A6	3	Total binding	TB	TB6	–	40		40	80	160	–
Fast	A7	1	Icke-radioaktiv E2	NSB	S0	$2,00 \times 10^{-6}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
Fast	A8	2	Icke-radioaktiv E2	NSB	S0	$2,00 \times 10^{-6}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
Fast	A9	3	Icke-radioaktiv E2	NSB	S0	$2,00 \times 10^{-6}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
Fast	A10	1	Icke-radioaktiv E2	NSB	S0	$2,00 \times 10^{-6}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
Fast	A11	2	Icke-radioaktiv E2	NSB	S0	$2,00 \times 10^{-6}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
Fast	A12	3	Icke-radioaktiv E2	NSB	S0	$2,00 \times 10^{-6}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
Fast	B1	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S1	$2,00 \times 10^{-7}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-7}$
Fast	B2	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S1	$2,00 \times 10^{-7}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-7}$
Fast	B3	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S1	$2,00 \times 10^{-7}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-7}$
Fast	B4	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S2	$2,00 \times 10^{-8}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-8}$
Fast	B5	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S2	$2,00 \times 10^{-8}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-8}$
Fast	B6	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S2	$2,00 \times 10^{-8}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-8}$
Fast	B7	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S3	$6,00 \times 10^{-9}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-9}$
Fast	B8	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S3	$6,00 \times 10^{-9}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-9}$
Fast	B9	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S3	$6,00 \times 10^{-9}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-9}$
Fast	B10	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S4	$2,00 \times 10^{-9}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-9}$
Fast	B11	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S4	$2,00 \times 10^{-9}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-9}$
Fast	B12	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S4	$2,00 \times 10^{-9}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-9}$
Fast	C1	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S5	$6,00 \times 10^{-10}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-10}$
Fast	C2	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S5	$6,00 \times 10^{-10}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-10}$
Fast	C3	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S5	$6,00 \times 10^{-10}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-10}$
Fast	C4	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S6	$2,00 \times 10^{-10}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-10}$
Fast	C5	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S6	$2,00 \times 10^{-10}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-10}$
Fast	C6	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S6	$2,00 \times 10^{-10}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-10}$
Fast	C7	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S7	$2,00 \times 10^{-11}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-11}$
Fast	C8	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S7	$2,00 \times 10^{-11}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-11}$
Fast	C9	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S7	$2,00 \times 10^{-11}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-11}$
Fast	C10	1	Blankprov	Blankprov	B1	–	–	160	–	–	160	–
Fast	C11	2	Blankprov	Blankprov	B2	–	–	160	–	–	160	–
Fast	C12	3	Blankprov	Blankprov	B3	–	–	160	–	–	160	–
Fast	D1	1	Noretynodrel	NE	WP1	$6,00 \times 10^{-5}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-5}$
Fast	D2	1	Noretynodrel	NE	WP1	$6,00 \times 10^{-5}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-5}$
Fast	D3	1	Noretynodrel	NE	WP1	$6,00 \times 10^{-5}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-5}$
Fast	D4	1	Noretynodrel	NE	WP2	$2,00 \times 10^{-5}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-5}$
Fast	D5	1	Noretynodrel	NE	WP2	$2,00 \times 10^{-5}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-5}$
Fast	D6	1	Noretynodrel	NE	WP2	$2,00 \times 10^{-5}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-5}$
Fast	D7	1	Noretynodrel	NE	WP3	$6,00 \times 10^{-6}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-6}$
Fast	D8	1	Noretynodrel	NE	WP3	$6,00 \times 10^{-6}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-6}$
Fast	D9	1	Noretynodrel	NE	WP3	$6,00 \times 10^{-6}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-6}$
Fast	D10	1	Noretynodrel	NE	WP4	$2,00 \times 10^{-6}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
Fast	D11	1	Noretynodrel	NE	WP4	$2,00 \times 10^{-6}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
Fast	D12	1	Noretynodrel	NE	WP4	$2,00 \times 10^{-6}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$

Upplägg för brunnar till test av kompetitiv bindning												
Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentra-tionskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hFEK-stamlösning (μl)	Buffertvolym (μl)	spårsubstans (radioaktiv E2)	Volym från spädningsplatta (μl)	Slutvolym (μl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
Fast	E1	1	Noretynodrel	NE	WP	$6,00 \times 10^{-7}$	40		40	80	160	$3,0 \times 10^{-7}$
Fast	E2	2	Noretynodrel	NE	WP	$6,00 \times 10^{-7}$	40		40	80	160	$3,0 \times 10^{-7}$
Fast	E3	3	Noretynodrel	NE	WP	$6,00 \times 10^{-7}$	40		40	80	160	$3,0 \times 10^{-7}$
Fast	E4	1	Noretynodrel	NE	WP	$2,00 \times 10^{-7}$	40		40	80	160	$1,0 \times 10^{-7}$
Fast	E5	2	Noretynodrel	NE	WP	$2,00 \times 10^{-7}$	40		40	80	160	$1,0 \times 10^{-7}$
Fast	E6	3	Noretynodrel	NE	WP	$2,00 \times 10^{-7}$	40		40	80	160	$1,0 \times 10^{-7}$
Fast	E7	1	Noretynodrel	NE	WP	$6,00 \times 10^{-8}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-8}$
Fast	E8	2	Noretynodrel	NE	WP	$6,00 \times 10^{-8}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-8}$
Fast	E9	3	Noretynodrel	NE	WP	$6,00 \times 10^{-8}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-8}$
Fast	E10	1	Noretynodrel	NE	WP	$6,00 \times 10^{-9}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-9}$
Fast	E11	2	Noretynodrel	NE	WP	$6,00 \times 10^{-9}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-9}$
Fast	E12	3	Noretynodrel	NE	WP	$6,00 \times 10^{-9}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-9}$
Fast	F1	1	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-3}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-3}$
Fast	F2	2	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-3}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-3}$
Fast	F3	3	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-3}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-3}$
Fast	F4	1	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-4}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-4}$
Fast	F5	2	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-4}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-4}$
Fast	F6	3	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-4}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-4}$
Fast	F7	1	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-5}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-5}$
Fast	F8	2	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-5}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-5}$
Fast	F9	3	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-5}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-5}$
Fast	F10	1	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-6}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
Fast	F11	2	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-6}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
Fast	F12	3	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-6}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
Fast	G1	1	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-7}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-7}$
Fast	G2	2	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-7}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-7}$
Fast	G3	3	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-7}$	40	–	40	80	160	$3,0 \times 10^{-7}$
Fast	G4	1	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-8}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-8}$
Fast	G5	2	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-8}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-8}$
Fast	G6	3	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-8}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-8}$
Fast	G7	1	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-9}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-9}$
Fast	G8	2	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-9}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-9}$
Fast	G9	3	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-9}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-9}$
Fast	G10	1	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-10}$	40	–	40	–	160	$1,0 \times 10^{-10}$
Fast	G11	2	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-10}$	40	–	40	–	160	$1,0 \times 10^{-10}$
Fast	G12	3	OTES	N	OTES	$2,00 \times 10^{-10}$	40	–	40	–	160	$1,0 \times 10^{-10}$
Fast	H1	1	Radioaktiv	H	H	–	–	–	40	–	40	–
Fast	H2	1	Radioaktiv	H	H	–	–	–	40	–	40	–
Fast	H3	1	Radioaktiv	H	H	–	–	–	40	–	40	–
Fast	H4	1	Radioaktiv	H	H	–	–	–	40	–	40	–
Fast	H5	1	Radioaktiv	H	H	–	–	–	40	–	40	–
Fast	H6	1	Radioaktiv	H	H	–	–	–	40	–	40	–
Fast	H7	1	Buffertkontroll	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
Fast	H8	1	Buffertkontroll	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
Fast	H9	1	Buffertkontroll	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
Fast	H10	1	Buffertkontroll	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
Fast	H11	1	Buffertkontroll	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
Fast	H12	1	Buffertkontroll	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–

Obs: brunnarna som märkts med ”radioaktiv” är tomma under inkubationen. Dessa 40 μl tillsätts endast i scintillationsräkningssyfte.

Upplägg för brunnar till test av kompetitiv bindning												
Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentra- tionskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hr/E-stam- lösning (μ l)	Buffervolym (μ l)	spårsubstans (radioaktiv E2)	Volym från spädningsplatta (μ l)	Slutvolym (μ l)	Slutkoncentra- tion av konkurr- erande ligand (M)
P1	A1	1	Total bindning	TB	TBB1B1	–	40	–	40	80	160	–
P1	A2	2	Total bindning	TB	TB2	–	40	–	40	80	160	–
P1	A3	3	Total bindning	TB	TB3	–	40	–	40	80	160	–
P1	A4	1	Total bindning	TB	TB4	–	40	–	40	80	160	–
P1	A5	2	Total bindning	TB	TB5	–	40	–	40	80	160	–
P1	A6	3	Total bindning	TB	TB6	–	40	–	40	80	160	–
P1	A7	1	Icke-radioaktiv	NSB	S0	$2,00 \times 10^{-6}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	A8	2	Icke-radioaktiv	NSB	S0	$2,00 \times 10^{-6}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	A9	3	Icke-radioaktiv	NSB	S0	$2,00 \times 10^{-6}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	A10	1	Icke-radioaktiv	NSB	S0	$2,00 \times 10^{-6}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	A11	2	Icke-radioaktiv	NSB	S0	$2,00 \times 10^{-6}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	A12	3	Icke-radioaktiv	NSB	S0	$2,00 \times 10^{-6}$	40	–	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	B1	1	Testkemikalie 1	TC1	1	$2,00 \times 10^{-3}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-3}$
P1	B2	2	Testkemikalie 1	TC1	1	$2,00 \times 10^{-3}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-3}$
P1	B3	3	Testkemikalie 1	TC1	1	$2,00 \times 10^{-3}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-3}$
P1	B4	1	Testkemikalie 1	TC1	2	$2,00 \times 10^{-4}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-4}$
P1	B5	2	Testkemikalie 1	TC1	2	$2,00 \times 10^{-4}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-4}$
P1	B6	3	Testkemikalie 1	TC1	2	$2,00 \times 10^{-4}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-4}$
P1	B7	1	Testkemikalie 1	TC1	3	$2,00 \times 10^{-5}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-5}$
P1	B8	2	Testkemikalie 1	TC1	3	$2,00 \times 10^{-5}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-5}$
P1	B9	3	Testkemikalie 1	TC1	3	$2,00 \times 10^{-5}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-5}$
P1	B10	1	Testkemikalie 1	TC1	4	$2,00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	B11	2	Testkemikalie 1	TC1	4	$2,00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	B12	3	Testkemikalie 1	TC1	4	$2,00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	C1	1	Testkemikalie 1	TC1	5	$2,00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-7}$
P1	C2	2	Testkemikalie 1	TC1	5	$2,00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-7}$
P1	C3	3	Testkemikalie 1	TC1	5	$2,00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-7}$
P1	C4	1	Testkemikalie 1	TC1	6	$2,00 \times 10^{-8}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-8}$
P1	C5	2	Testkemikalie 1	TC1	6	$2,00 \times 10^{-8}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-8}$
P1	C6	3	Testkemikalie 1	TC1	6	$2,00 \times 10^{-8}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-8}$
P1	C7	1	Testkemikalie 1	TC1	7	$2,00 \times 10^{-9}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-9}$
P1	C8	2	Testkemikalie 1	TC1	7	$2,00 \times 10^{-9}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-9}$
P1	C9	3	Testkemikalie 1	TC1	7	$2,00 \times 10^{-9}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-9}$
P1	C10	1	Testkemikalie 1	TC1	8	$2,00 \times 10^{-10}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-10}$
P1	C11	2	Testkemikalie 1	TC1	8	$2,00 \times 10^{-10}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-10}$
P1	C12	3	Testkemikalie 1	TC1	8	$2,00 \times 10^{-10}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-10}$
P1	D1	1	Testkemikalie 2	TC2	1	$2,00 \times 10^{-3}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-3}$
P1	D2	2	Testkemikalie 2	TC2	1	$2,00 \times 10^{-3}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-3}$
P1	D3	3	Testkemikalie 2	TC2	1	$2,00 \times 10^{-3}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-3}$
P1	D4	1	Testkemikalie 2	TC2	2	$2,00 \times 10^{-4}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-4}$
P1	D5	2	Testkemikalie 2	TC2	2	$2,00 \times 10^{-4}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-4}$
P1	D6	3	Testkemikalie 2	TC2	2	$2,00 \times 10^{-4}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-4}$
P1	D7	1	Testkemikalie 2	TC2	3	$2,00 \times 10^{-5}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-5}$
P1	D8	2	Testkemikalie 2	TC2	3	$2,00 \times 10^{-5}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-5}$
P1	D9	3	Testkemikalie 2	TC2	3	$2,00 \times 10^{-5}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-5}$
P1	D10	1	Testkemikalie 2	TC2	4	$2,00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	D11	2	Testkemikalie 2	TC2	4	$2,00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	D12	3	Testkemikalie 2	TC2	4	$2,00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	E1	1	Testkemikalie 2	TC2	5	$2,00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-7}$
P1	E2	2	Testkemikalie 2	TC2	5	$2,00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-7}$
P1	E3	3	Testkemikalie 2	TC2	5	$2,00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-7}$

Upplägg för brunnar till test av kompetitiv bindning

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentra- tionskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stam- lösning (nM)	Buffertvolym (µl)	spårsubstans (radioaktiv E2)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentra- tion av konkurr- erande ligand (M)
P1	E4	1	Testkemikalie 2	TC2	6	–	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-8}$
P1	E5	2	Testkemikalie 2	TC2	6	–	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-8}$
P1	E6	3	Testkemikalie 2	TC2	6	–	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-8}$
P1	E7	1	Testkemikalie 2	TC2	7	$2,00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-9}$
P1	E8	2	Testkemikalie 2	TC2	7	$2,00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-9}$
P1	E9	3	Testkemikalie 2	TC2	7	$2,00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-9}$
P1	E10	1	Testkemikalie 2	TC2	8	$2,00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-10}$
P1	E11	2	Testkemikalie 2	TC2	8	$2,00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-10}$
P1	E12	3	Testkemikalie 2	TC2	8	$2,00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-10}$
P1	F1	1	Testkemikalie 3	TC3	1	$2,00 \times 10^{-3}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-3}$
P1	F2	2	Testkemikalie 3	TC3	1	$2,00 \times 10^{-3}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-3}$
P1	F3	3	Testkemikalie 3	TC3	1	$2,00 \times 10^{-3}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-3}$
P1	F4	1	Testkemikalie 3	TC3	2	$2,00 \times 10^{-4}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-4}$
P1	F5	2	Testkemikalie 3	TC3	2	$2,00 \times 10^{-4}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-4}$
P1	F6	3	Testkemikalie 3	TC3	2	$2,00 \times 10^{-4}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-4}$
P1	F7	1	Testkemikalie 3	TC3	3	$2,00 \times 10^{-5}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-5}$
P1	F8	2	Testkemikalie 3	TC3	3	$2,00 \times 10^{-5}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-5}$
P1	F9	3	Testkemikalie 3	TC3	3	$2,00 \times 10^{-5}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-5}$
P1	F10	1	Testkemikalie 3	TC3	4	$2,00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	F11	2	Testkemikalie 3	TC3	4	$2,00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	F12	3	Testkemikalie 3	TC3	4	$2,00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	G1	1	Testkemikalie 3	TC3	5	$2,00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-7}$
P1	G2	2	Testkemikalie 3	TC3	5	$2,00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-7}$
P1	G3	3	Testkemikalie 3	TC3	5	$2,00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-7}$
P1	G4	1	Testkemikalie 3	TC3	6	$2,00 \times 10^{-8}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-8}$
P1	G5	2	Testkemikalie 3	TC3	6	$2,00 \times 10^{-8}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-8}$
P1	G6	3	Testkemikalie 3	TC3	6	$2,00 \times 10^{-8}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-8}$
P1	G7	1	Testkemikalie 3	TC3	7	$2,00 \times 10^{-9}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-9}$
P1	G8	2	Testkemikalie 3	TC3	7	$2,00 \times 10^{-9}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-9}$
P1	G9	3	Testkemikalie 3	TC3	7	$2,00 \times 10^{-9}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-9}$
P1	G10	1	Testkemikalie 3	TC3	8	$2,00 \times 10^{-10}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-10}$
P1	G11	2	Testkemikalie 3	TC3	8	$2,00 \times 10^{-10}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-10}$
P1	G12	3	Testkemikalie 3	TC3	8	$2,00 \times 10^{-10}$	40	0	40	80	160	$1,0 \times 10^{-10}$
P1	H1	1	Noretynodrel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	Noretynodrel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	Noretynodrel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	Noretynodrel	NE		$1,00 \times 10^{-4,5}$	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	Noretynodrel	NE		$1,00 \times 10^{-4,5}$	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	Noretynodrel	NE		$1,00 \times 10^{-4,5}$	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	Icke-radioaktiv			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	Icke-radioaktiv			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	Icke-radioaktiv			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	Icke-radioaktiv			$1,00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	Icke-radioaktiv			$1,00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	Icke-radioaktiv			$1,00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	

Tillägg 3

CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTES (CERI) *IN VITRO*-TEST AV ÖSTROGENRECEPTORBINDNING MED HUMANT, REKOMBINANT, LIGANDBINDANDE ERA-DOMÄNPROTEIN

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR (SE ÄVEN ALLMÄN INLEDNING)

1. Detta *in vitro*-test av mättnad hos och kompetitiv bindning till östrogenreceptor (ER α) använder sig av den ligandbindande domänen (LBD) hos det humana ER α (hrER α). Denna proteinmodell har framställts av Chemicals evaluation research institute (CERI), Japan, och är ett glutation-S-transferas- (GST) fusionsprotein som uttrycks i *E. coli*. Protokollet prövades i en internationell valideringsstudie som involverade flera laboratorier (2) och vilken visade dess relevans och pålitlighet för det avsedda syftet.
2. Detta test är ett screeningförfarande för identifiering av ämnen som kan binda till hrER α . Det används för att fastställa en testkemikalies förmåga att konkurrera med 17 β -estradiol i bindning till hrER α :s ligandbindande domän. Kvantitativa testresultat kan omfatta IC₅₀ (ett mått på den koncentration av testkemikalie som behövs för att tränga bort hälften av [³H]-17 β -estradiolen från hrER α) och testkemikaliernas relativa bindningsaffiniteter för hrER α , jämförda med den hos 17 β -estradiol. För kemisk screening kan godtagbara kvalitativa testresultat omfatta klassificeringar av testkemikalier som antingen hrER α -bindare, icke-bindare eller tvetydiga, utifrån de kriterier som beskrivits för bindningskurvorna.
3. Testet använder en radioaktiv ligand, vilket kräver att laboratoriet har licens för att hantera radioaktiva material. Allt handhavande av radioisotoper och farliga kemikalier ska följa de regelverk och rutiner som föreskrivs av nationell lagstiftning.
4. Läs ”ALLMÄN INLEDNING” och ”hrER-BINDNINGSTESTETS DELAR” innan testet används för tillsynsändamål. Definitioner och förkortningar som används i denna testriktlinje beskrivs i tillägg 1.

TESTETS PRINCIP (SE ÄVEN ALLMÄN INLEDNING)

5. Bindningstestet med hrER α mäter förmågan hos radioaktivt inmärkt ligand ([³H]-17 β -estradiol) att binda till ER i närvaron av ökande koncentrationer av testkemikalie (dvs. konkurrerande ligand). Testkemikalier med hög affinitet för ER konkurrerar med den radioaktivt inmärkta liganden vid en lägre koncentration än de kemikalier som har lägre affinitet för receptorn.
6. Detta test består av två huvuddelar: ett mättnadsbindningsexperiment för att karakterisera receptor–ligandinteraktionsparametrar, följt av ett kompetitivt bindningsexperiment som karakteriserar konkurrensen mellan en testkemikalie och en radioaktivt inmärkt ligand vid inbindning till ER.

7. Mättnadsbindningsexperimentets syfte är att inför det kompetitiva bindningsexperimentet karakterisera en receptorsats med avseende på bindingsaffinitet och antal receptorer. Mättnadsbindningsexperimentet mäter, vid jämviktsförhållanden och en fast receptorkoncentration, östrogenreceptorers affinitet för dess naturliga ligand (mätt som dissociationskonstant, K_d) och koncentrationen av aktiva bindningsplatser (B_{max}).
8. Det kompetitiva bindningsexperimentet mäter benägenheten hos ett ämne att konkurrera med [^3H]-17 β -estradiol om att binda till ER. Affiniteten kvantifieras genom koncentrationen av testkemikalie som, vid jämvikt, hämmar 50 % av den specifika bindningen av [^3H]-17 β -estradiol (kallad hämmande koncentration 50 %, eller IC_{50}). Detta kan också utvärderas med hjälp av den relativa bindingsaffiniteten (RBA, affiniteten jämförd med IC_{50} för estradiol som mäts separat i samma testomgång). Det kompetitiva bindningsexperimentet mäter bindningen av [^3H]-17 β -estradiol vid en fast koncentration i närvaron av ett stort intervall (åtta tiopotenser) av testkemikaliekoncentrationer. Data anpassas sedan, där så är möjligt, till en form av Hill-ekvationen (Hill, 1910) som beskriver bortträngningen av den radioaktivt märkta liganden av en kompetitiv bindare som binder till en bindningsplats. Den utsträckning i vilken den radioaktivt inmärkta estradiolen trängs bort vid jämvikt används för att karakterisera testkemikalien som en bindare, en icke-bindare eller med tvetydig respons.

FÖRFARANDE

Fastställande av acceptabel proteinfunktion hos hrER α

9. Innan rutinmässiga tester av mättnad och kompetitiv bindning genomförs ska varje ny sats av hrER α visas fungera korrekt i det laboratorium där den ska användas. En tvåstegsproceduren bör användas för att kontrollera prestanda. Dessa steg är som följer:
 - Utför ett mättnadsbindningstest med [^3H]-17 β -estradiol för att fastställa specificitet och mättnad hos hrER α . Icke-linjär regressionsanalys av dessa data (t.ex. BioSoft, McPherson, 1985, Motulsky, 1995) och påföljande Scatchard-diagram ska dokumentera [^3H]-17 β -estradiolens bindingsaffinitet för hrER α (K_d) samt antalet receptorer (B_{max}) för varje sats av hrER α .
 - Genomför ett kompetitivt bindningstest med hjälp av kontrollämnena (referensöstrogen, 17 β -estradiol), en svag bindare (t.ex. noretynodrel eller noretindron) och en icke-bindare (oktyltriethoxysilan, OTES). Varje laboratorium ska upprätta en historisk databas för att dokumentera överensstämmelsen hos IC_{50} och andra relevanta värden för referensöstrogenet och svaga bindaren, mellan olika experiment och olika hrER α -satser. Dessutom ska parametrarna för kontrollämnenas kurvor över kompetitiv bindning vara inom gränserna för 95-procentigt konfidensintervall (se tabell 1), vilka har tagits fram med data från laboratorier som deltog i valideringsstudien för detta test (2).

Tabell 1: Prestandakriterier framtagna för referensöstrogen och svag bindare, CERI-hrER-bindningstest.

Ämne	Parameter	Medelvärde ^a	Standard-avvikelse (n)	95 % konfidensintervall ^b	
				Nedre gräns	Övre gräns
17β-estradiol	Topp	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Botten	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hill-koefficient (Hill slope)	-1,22	0,20 (70)	-1,27	-1,17
	Log(IC ₅₀)-värde	-8,93	0,23 (70)	-8,98	-8,87
Noretynodrel	Topp	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Botten	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hill-koefficient (Hill slope)	-1,04	0,21 (68)	-1,09	-0,99
	Log(IC ₅₀)-värde	-6,19	0,40 (68)	-6,29	-6,10
Noretindron^c	Topp	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Botten	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hill-koefficient (Hill slope)	-1,18	0,32 (23)	-1,31	-1,04
	Log(IC ₅₀)-värde	-6,01	0,54 (23)	-6,25	-5,78

^a Medelvärde $\pm$ standardavvikelse (SD) med provantal (n) beräknades genom skattning av kurvanpassningsparametrar (fyraparameters Hill-ekvation) för kontrollomgångar som utförts av fyra laboratorier under valideringsstudien (se bilaga N i referens 2).

^b Gränserna för 95-procentigt konfidensintervall anges som en vägledning för acceptanskriterier.

^c Test av noretindron var valfritt för deluppgift 4 under valideringsstudien (se referens 2, deluppgift 4). Således beräknades medelvärdet $\pm$ SD (n) med hjälp av skattade kurvanpassningar (fyraparameters Hill-ekvation) för kontrollomgångar, utförda av två laboratorier.

Intervallet för IC₅₀ kommer att vara beroende av receptorberedningens K_d och koncentrationen av radioaktivt inmärkt ligand som används vid de olika laboratorierna. Lämplig justering för IC₅₀-intervallet, baserad på de betingelser som används för att genomföra testet, kommer att kunna godtas.

Uppvisande av laboratoriets färdighet

- Se punkterna 17 och 18 och tabell 2 i ”**hrER-BINDNINGSTESTETS DELAR**” i denna testmetod. Varje test (mättnad och kompetitiv bindning) ska bestå av tre oberoende testomgångar (dvs. med nya spädningar av receptor, kemikalier och reagens) på olika dagar och varje omgång ska innehålla tre replikat.

Bestämning av hrER α -koncentration

- Koncentrationen av aktiv receptor varierar något mellan satser och med förvaringsförhållanden. Därför ska koncentrationen av aktiv receptor som erhållits från leverantören fastställas. Detta ger tillämplig koncentration av aktiv receptor när testomgången ska göras.

12. Under förhållanden som motsvarar kompetitiv bindning (dvs. 0,5 nM [^3H]-inmärkt estradiol), ska nominella koncentrationer om 0,1, 0,2, 0,4 och 0,6 nM receptor inkuberas i frånvaro (total bindning) och närvaro (icke-specifik bindning) av 1 μM ej inmärkt estradiol. Specifik bindning, beräknad som differensen av total och icke-specifik bindning, ritas i ett diagram mot den nominella receptorkoncentrationen. Den receptorkoncentration som ger specifika bindningsvärden motsvarande 40 % av tillsatt radioaktivt inmärkt ligand relateras till motsvarande receptorkoncentration, och denna receptorkoncentration ska användas för tester av mättnad och kompetitiv bindning. Ofta överensstämmer en slutlig hrER-koncentration på 0,2 nM med detta förhållande.
13. Om 40-procentskriteriet vid upprepade försök inte kan uppfyllas ska experimentets uppställning kontrolleras för möjliga fel. Svårigheter att uppnå 40-procentskriteriet kan indikera att det finns väldigt lite aktiv receptor i satsen med rekombinant receptor och man bör då överväga att använda en annan sats.

Mättnadstest

14. Åtta ökande koncentrationer av [^3H]-17 β -estradiol ska utvärderas i tripletter, enligt följande tre betingelser (se tabell 2):
- I frånvaron av ej inmärkt 17 β -estradiol och närvaro av ER. Här fastställs total bindning genom att mäta radioaktiviteten i de brunnar som enbart innehåller [^3H]-17 β -estradiol.
 - I närvaron av 2000 gångers koncentrationsöverskott av ej inmärkt 17 β -estradiol över inmärkt 17 β -estradiol och närvaro av ER. Avsikten med denna betingelse är att mäta de aktiva bindningsplatserna med ej inmärkt 17 β -estradiol och, genom att mäta radioaktiviteten i brunnarna, fastställa den icke-specifika bindningen. Eventuellt kvarvarande radioaktiv estradiol som kan binda till receptorn anses binda till en icke-specifik bindningsplats eftersom den tillsatta icke-radioaktiva estradiolen ska ha så hög koncentration att den har bundit till alla specifika bindningsplatser på receptorn.
 - I frånvaro av ej inmärkt 17 β -estradiol och frånvaro av ER (fastställande av total radioaktivitet).

Beredning av lösningar med [^3H]-17 β -estradiol respektive ej inmärkt 17 β -estradiol och hrER α

15. En 40 nM lösning av [^3H]-17 β -estradiol ska beredas från en 1 μM stamlösning av [^3H]-17 β -estradiol i DMSO, genom att tillsätta DMSO (för att bereda 200 nM) och testbuffert vid rumstemperatur (för att bereda 40 nM). Med hjälp av denna 40 nM-lösning, bereds seriespädningen av [^3H]-17 β -estradiol i koncentrationer från 0,313 nM till 40 nM med rumstempererad testbuffert (som angivet i kolumn 12 i tabell 2). De slutliga testkoncentrationerna, från 0,0313 nM till 4,0 nM, erhålls genom att tillsätta 10 μl av dessa lösningar till respektive testbrunnar i en 96-hålmikrotiterplatta (se tabellerna 2 och 3). Beredning av testbuffert, beräkning av ursprunglig stamlösning av [^3H]-17 β -estradiol utifrån dess specifika aktivitet, beredning av spädningar och fastställande av koncentrationer beskrivs i detalj i CERI-protokollet (2).

16. Spädningar av ej inmärkt 17 β -estradiollösningar ska beredas från en 1 nM 17 β -estradiolstamlösning genom att tillsätta testbuffert och på så sätt erhålla åtta ökande koncentrationer, initialt från 0,625 μ M till 80 μ M. De slutliga testkoncentrationerna, från 0,0625 till 8 μ M, erhålls genom att tillsätta 10 μ l av dessa lösningar till respektive testbrunnar i en 96-hålmikrotiterplatta som reserverats för att mäta icke-specifik bindning (se tabellerna 2 och 3). Beredning av spädningar av ej inmärkt 17 β -estradiol beskrivs i detalj i CERI-protokollet (2).
17. Den receptorkoncentration som ger specifik bindning av 40 ± 10 % bör användas (se punkterna 12–13). Lösningen med hrER α ska beredas med iskall testbuffert omedelbart före dess användning, det vill säga efter att alla brunnar för total bindning, icke-specifik bindning och enbart radioaktiv ligand har beretts.
18. Förbered 96-hålmikrotiterplattorna enligt schema i tabell 2, med 3 replikat per [^{3} H]-17 β -estradiolkoncentration. Fördelning över plattan av volymer av [^{3} H]-17 β -estradiol, ej inmärkt 17 β -estradiol, buffert och receptor ges i tabell 3.

Tabell 2: Upplägg för mikrotiterplatta till mättnadsbindningstest

	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10	11*	12*
	För mätning av TB			För mätning av NSB			För kvantitativ analys av enbart radioaktiv ligand				Ej inmärkt E2-spädningar för plattkolumn	[^{3} H]E2-spädningar för plattkolumn 1–9
A	0,0313 nM [^{3} H]E2 + ER			0,0313 nM [^{3} H]E2 + 0,0625 μ M E2 + ER			0,0313 nM				0,625 μ M	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3} H]E2 + ER			0,0625 nM [^{3} H]E2 + 0,125 μ M E2 + ER			0,0625 nM				1,25 μ M	0,625 nM
C	30,125 nM [^{3} H]E2 + ER			0,125 nM [^{3} H]E2 + 0,25 μ M E2 + ER			0,125 nM				2,5 μ M	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3} H]E2 + ER			0,250 nM [^{3} H]E2 + 0,5 μ M E2 + ER			0,250 nM				5 μ M	2,5 nM
E	0,50 nM [^{3} H]E2 + ER			0,50 nM [^{3} H]E2 + 1 μ M E2 + ER			0,50 nM				10 μ M	5 nM
F	1,00 nM [^{3} H]E2 + ER			1,00 nM [^{3} H]E2 + 2 μ M E2 + ER			1,00 nM				20 μ M	10 nM
G	2,00 nM [^{3} H]E2 + ER			2,00 nM [^{3} H]E2 + 4 μ M E2 + ER			2,00 nM				40 μ M	20 nM
H	4,00 nM [^{3} H]E2 + ER			4,00 nM [^{3} H]E2 + 8 μ M E2 + ER			4,00 nM				80 μ M	40 nM

TB: Total bindning.

NSB: Icke-specifik bindning.

[³H]E2: [³H]-17β-estradiol.

E2: ej inmärkt 17β-estradiol.

* Här angivna koncentrationer är slutkoncentrationerna i varje brunn.

** Spädningarna av ej inmärkt E2 och [³H]E2 kan beredas i en annan platta.

Tabell 3: Volymmer för reagenser till mättnadstest i mikrotiterplatta

Kolumn-nummer		1	2	3	4	5	6	7*	8*	9*
Beredningssteg		TB-brunnar			NSB-brunnar			Endast radioaktivt		
Volymmer för beståndsdelar till ovan nämnda reaktionsbrunnar och turordning för tillsats	Buffert	60 µl			50 µl			90 µl		
	Ej inmärkt E2 från kolumn 11 i tabell 2	–			10 µl			–		
	[³ H]E2 från kolumn 12 i tabell	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			–		
Total reaktionsvolym		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubation		EFTER 2 TIMMARS INKUBATION						Kvantifiering av radioaktiviteten precis efter beredning. Ingen inkubation		
Behandling med 0,4 % DCC		Ja			Ja			Nej		
Volym av 0,4 % DCC		100 µl			100 µl			–		
Filtrering		Ja			Ja			Nej		
DPM-MÄTNING										
Kvantifieringsvolym att tillsätta till scintillationsblandningen		100 µl**			100 µl**			50 µl		

* Om en vätskescintillationsräknare för mikrotiterplattor används för dpm-mätning är det inte lämpligt att bereda enbart radioaktivt märkt ligand i samma platta som TB och NSB. Den radioaktivt märkta liganden ska beredas separat i en annan platta.

** Om centrifugering används för att avskilja DCC bör de 50 µl supernatant mätas i vätskescintillationsräknare för att undvika att DCC förorenar provet.

19. Testmikrotiterplattor avsedda för bestämning av total bindning och icke-specifik bindning bör inkuberas vid rumstemperatur (22 °C till 28 °C) i två timmar.

Mätning av [³H]-17β-estradiol bunden till hrERα

20. Efter två timmars inkubation ska den [³H]-17β-estradiol som bundit till hrERα separeras från obunden [³H]-17β-estradiol genom tillsats av 100 µl iskall 0,4 % DCC-suspension till brunnarna. Plattorna ska då placeras på is i 10 minuter och reaktionsblandningen och DCC-suspensionen filtreras, genom att överföras till ett mikrotiterplattfilter, för att avlägsna DCC. Därefter ska 100 µl av filtratet tillsättas till scintillationsvätskan i scintillationsvialer

för bestämning av sönderfall per minut (disintegrations per minute, dpm) i varje vial med hjälp av vätskescintillationsräknare.

21. Alternativt, om mikrotiterplattfilter inte finns att tillgå, kan DCC avlägsnas genom centrifugering. Sedan tas 50 µl supernatant, innehållande den hrERα-bundna [³H]-17β-estradiolen, extremt försiktigt så att man inte råkar förorena brunnarna genom att vidröra DCC och används för scintillationsräkning.
22. Betingelsen med enbart radioaktivt märkt ligand används för att fastställa sönderfall per minut (dpm) hos den [³H]-17β-estradiol som har tillsatts till testbrunnarna. Radioaktiviteten ska kvantifieras precis efter beredning. Dessa brunnar ska inte inkuberas och inte heller behandlas med DCC-suspension utan tillsätts direkt till scintillationsvätskan. Dessa mätningar visar, i dpm, hur mycket [³H]-17β-estradiol som tillsattes till varje uppsättning brunnar för total bindning och icke-specifik bindning.

Kompetitivt bindningstest

23. Det kompetitiva bindningstestet mäter bindningen av [³H]-17β-estradiol vid en viss koncentration i närvaro av ökande koncentration av testkemikalie. Tre parallella replikat bör användas för varje koncentration i varje testomgång. Dessutom bör tre icke-parallella testomgångar utföras för varje testad kemikalie. Testet bör utföras i en eller flera 96-hålsmikrotiterplattor.

Kontroller

24. Varje experiment ska inkludera parallella lösningsmedelprover och kontroller (dvs. referensöstroger, svag bindare och icke-bindare). Fullständiga koncentrationskurvor för östrogerreferens och kontroller (dvs. svag bindare resp. icke-bindare) ska placeras i en platta vid varje testomgång. Alla andra plattor ska innehålla: i) en hög koncentration (maximal bortträngning, dvs. ungefär fullständig bortträngning av radioaktivt inmärkt ligand) och en mellankoncentration (ungefär IC₅₀) av E2 respektive svag bindare i tripletter, ii) lösningsmedelskontroll och icke-specifik bindning, båda som tripletter. Förfaranden för beredning av testbuffert [³H]-17β-estradiol, hrERα och testkemikalielösningar beskrivs ingående i CERI-protokollet (2).

Lösningsmedelskontroll

25. Lösningsmedelskontrollen indikerar att lösningsmedlet inte interagerar med testsystemet och mäter också total bindning (TB). Det mest lämpliga lösningsmedlet är DMSO. Men om testkemikalien högsta koncentration inte är lös i DMSO kan etanol användas. Koncentrationen av DMSO i de slutliga testbrunnarna ska vara 2,05 % och kan ökas till 2,5 % om testkemikalien visar bristande löslighet. Koncentrationer av DMSO över 2,5 % ska inte användas eftersom högre koncentrationer av lösningsmedel interfererar med testet. Till testkemikalier som inte är lösliga i DMSO men lösliga i etanol kan ett maximum av 2 % etanol användas i testet utan interferens.

Buffertkontroll

26. Buffertkontrollen (BC) ska inte innehålla vare sig lösningsmedel eller testkemikalie men testets alla övriga ingående delar. Resultaten för buffertkontrollen jämförs med lösningsmedelskontrollen för att säkerställa att det valda lösningsmedlet inte påverkar testsystemet.

Stark bindare (referensöstrogon)

27. Den endogena liganden är 17β -estradiol (CAS-nr 50-28-2) och den binder med hög affinitet till alfa-subtypen av ER. En standardkurva med ej inmärkt 17β -estradiol ska upprättas för varje kompetitivt hrER α -bindningstest, för att möjliggöra en bedömning av variationen när testet, över tid, upprepas i samma laboratorium. Åtta lösningar av ej inmärkt 17β -estradiol ska beredas i DMSO och testbuffert för att användas till standardkurvan, med slutlig koncentration i testbrunnarna och spridning som följer: 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , $10^{-8,5}$, 10^{-9} , $10^{-9,5}$, 10^{-10} , 10^{-11} M. Den högsta koncentrationen av ej inmärkt 17β -estradiol (1 μ M) bör tjäna som indikator för icke-specifik bindning. Denna koncentration markeras med märkningen ”NSB” i tabell 4 även om den också är en del av standardkurvan.

Svag bindare

28. En svag bindare (noretynodrel [CAS-nr 68-23-5] eller alternativt noretindron [CAS-nr 68-22-4]) bör inkluderas för att påvisa varje experiments känslighet och möjliggöra en bedömning av variation när testet används längre perioder. Åtta lösningar av den svaga bindaren ska beredas i DMSO och testbuffert för att användas till standardkurvan, med slutlig koncentration i testbrunnarna som följer: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6} , $10^{-6,5}$, 10^{-7} , $10^{-7,5}$, 10^{-8} och 10^{-9} M.

Icke-bindare

29. Oktyltriethoxisilan (OTES, CAS-nr 2943-75-1) ska användas som negativ kontroll (icke-bindare). Den ger återkoppling om att testet, så som det utförs, kommer att detektera testkemikalier som inte binder till hrER α . Åtta lösningar av icke-bindaren ska beredas i DMSO och testbuffert för att användas till standardkurvan, med slutlig koncentration i testbrunnarna som följer: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M. Di-n-butylftalat (DBP, CAS-nr 84-72-2) kan användas som alternativ icke-bindare, men är endast testad upp till 10^{-4} M. Maximal löslighet för DBP i testet har visats vara 10^{-4} M.

hrER α -koncentration

30. Den mängd receptor som ger en specifik bindning på 40 ± 10 % bör användas (se punkterna 12–13 i tillägg 3). Lösningen med hrER α ska beredas genom spädning av funktionellt hrER α i iskall testbuffert, omedelbart före användning.

[^{3} H]- 17β -estradiol

31. Slutkoncentrationen av [^{3} H]- 17β -estradiol i testbrunnarna bör vara 0,5 nM.

Testkemikalier

32. Vid det första tillfället är det nödvändigt att genomföra ett löslighetstest för att fastställa löslighetsgränsen för varje testkemikalie och för att identifiera lämpligt koncentrationsintervall att använda sig av under testet. Samtliga testkemikaliers respektive

löslighetsgräns i lösningsmedlet ska fastställas initialt och vidare bekräftas under testbetingelser. Den i testet testade slutkoncentrationen bör inte överstiga 1 mM. Intervallsökning omfattar en lösningsmedelskontroll och minst åtta logaritmiska seriespädningar, som börjar vid maximal acceptabel koncentration (t.ex. 1 mM eller lägre, baserat på löslighetsgräns), och närvaron av iakttagen grumlighet eller fällning (se även punkt 35 i tillägg 3). När koncentrationsintervallet för testet har fastställts, ska en testkemikalie testas med åtta logaritmiska koncentrationer, lämpligt utspridda enligt definitionen i det föregående intervallsökningstestet. Koncentrationer i det andra och tredje experimenten bör, vid behov, anpassas ytterligare för en bättre identifiering av koncentration–responskurvan.

33. Spädningar av testkemikalien ska beredas i lämpligt lösningsmedel (se punkt 25 i tillägg 3). Om testkemikalien högsta koncentration inte är lös i vare sig DMSO eller etanol, och en tillsats av mer lösningsmedel skulle göra att koncentrationen av lösningsmedel i det slutliga provröret överskred den godtagbara gränsen, kan den högsta koncentrationen sänkas till nästa lägre koncentration. I sådana fall kan ytterligare en koncentration läggas till i den lägre änden av koncentrationsserien. Övriga koncentrationer i serien bör förbli oförändrade.
34. Testkemikalielösningarna ska iakttas noggrant vid tillsatsen till testbrunnen, eftersom testkemikalien kan falla ut i detta steg. Data för alla brunnar som innehåller en fällning ska uteslutas från kurvanpassning och anledningen till uteslutningen av data noteras.
35. Om det sedan tidigare från andra källor finns information som tillhandahåller ett $\log(\text{IC}_{50})$ -värde för en testkemikalie, kan det vara lämpligt att geometriskt sprida spädningarna närmre runt det förväntade $\log(\text{IC}_{50})$ -värdet (dvs. 0,5 log-enheter). Slutresultaten bör återspegla tillräcklig spridning av koncentrationer på båda sidor om $\log(\text{IC}_{50})$ -värdet, inklusive ”topp” och ”botten”, så att bindningskurvan kan karakteriseras tillfredsställande.

Organisering av testplattor

36. Märkta mikrotiterplattor ska beredas för sexfaldiga inkubationer med lösningsmedelskontrollen, den högsta koncentrationen av referensöstroge (E2) som också tjänar som indikator på icke-specifik bindning (NSB), och buffertkontrollen, de åtta koncentrationerna av icke-bindande kontroll (oktyltrietyoxisilan), de sju lägre koncentrationerna av referensöstroge (E2), de åtta koncentrationerna av svag bindare (noretynodrel eller noretindron) och de åtta koncentrationerna av varje testkemikalie (TC). Ett exempel på upplägget med plattschema över fullständiga koncentrationskurvor för referensöstroge och kontroller ges nedan i tabell 4. Ytterligare mikrotiterplattor används för testkemikalierna och ska inkludera plattkontroller, det vill säga i) en hög koncentration (maximal bortträngning) och en mellankoncentration (ungefär IC_{50}) av vardera E2 och svag bindare i triplikat, ii) lösningsmedelskontroll (som total bindning) och icke-specifik bindning, båda sexfaldiga (tabell 5). Ett exempel på plattupplägg för ett kompetitivt test med tre okända testkemikalier ges i tillägg 3.3. De koncentrationer som anges i tabellen, samt i tabeller 4 och 5, avser slutkoncentrationer i testbrunnarna. Maximal koncentration för E2 ska vara 1×10^{-7} M och för den svaga bindaren bör den högsta koncentrationen som används för den svaga bindaren på platta 1 användas. Laboratoriet ska fastställa IC_{50} med

hjälp av sin historiska kontrolldatabas. Detta värde kan förväntas vara jämförbart med det som iakttagits i valideringsstudierna (se tabell 1).

Tabell 4: Upplägg för mikrotiterplatta till kompetitivt bindningstest^{1,2}, fullständiga koncentrationskurvor för referensöstrogen och kontroller (platta 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Buffertkontroll och positiv kontroll (E2)			Svagt positiv (Noretynodrel)			Negativ kontroll (OTES)			TB och NSB		
A	Blankprov*			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (lösningsmedelskontroll) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1 \times 10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1 \times 10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Buffertkontroll		
F	E2 ($1 \times 10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1 \times 10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Blankprov (radioaktivitet)**		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1 \times 10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

¹ Provuppsättning för standard-mikrotiterplatta som ska ingå i varje experiment.

² Notera att denna mikrotiterplatta ställs i ordning genom att använda de spädningar i spädningsplattan som beskrivs för standarder i föregående avsnitt.

I detta exempel är den svaga bindaren noretinodrel (NE).

* Faktiskt blankprov, brunnen används inte.

** Blankprov, används inte under inkubationen, men för att bekräfta total, tillsatt radioaktivitet.

Tabell 5: Upplägg för mikrotiterplatta till kompetitivt bindningstest, tillkommande plattor för testkemikalier (TC) och plattkontroller.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Testkemikalie 1 (TC-1)			Testkemikalie-2 (TC-2)			Testkemikalie-3 (TC-3)			Kontroller		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7} M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E2 (IC ₅₀)		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1 \times 10^{-4,5}$ M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC ₅₀)		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		

F	TC-1 (1×10^{-5} M)	TC-2 (1×10^{-5} M)	TC-3 (1×10^{-5} M)	
G	TC-1 (1×10^{-4} M)	TC-2 (1×10^{-4} M)	TC-3 (1×10^{-4} M)	(TB) (Lösningsmedelskontroll)
H	TC-1 (1×10^{-3} M)	TC-2 (1×10^{-3} M)	TC-3 (1×10^{-3} M)	

I detta exempel är den svaga bindaren noretinodrel (NE).

Slutförande av kompetitiv bindningstest

37. Med undantag för brunnarna för total bindning och blankprov (för radioaktiv märkning), så som visas i tabell 6, ska 50 µl av testbufferten överföras till varje brunn och blandas med 10 µl lösningsmedelskontroll, referensöstroger (E2), svag bindare, icke-bindare eller testkemikalier och 10 µl av en 5 nM [^{3} H]-17β-estradiollösning. Sedan tillsätts 30 µl iskall receptorlösning till varje platta och blandas försiktigt. Lösningen med hrERα ska vara den sista reagens som tillsätts till brunnarna. Testmikrotiterplattorna inkuberas i rumstemperatur (22–28 °C) i 2 timmar.

Tabell 6: Tillsatsvolym av beståndsdelar till kompetitiv bindningstest för hrER, i mikrotiterplattor

Kolumn-nummer, beredningssteg		Andra än TB-brunnar	TB-brunnar	Blankprov (för radioaktiv märkning)
Volym för beståndsdelar till ovan nämnda reaktionsbrunnar och turordning för tillsats	Rumstempererad testbuffert	50 µl	60 µl	90 µl
	Ej inmärkt E2, svag bindare, icke-bindare, lösningsmedel och testkemikalier*	10 µl	–	–
	[^{3} H]-17β-estradiol för att ge en slutkoncentration på 0,5 nM (dvs. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	Fastställd hrERα-koncentration (se punkterna 12–13)	30 µl	30 µl	–
Total volym i varje testbrunn		100 µl	100 µl	100 µl

* Korrekt beredda så att de ger slutkoncentration inom godtagbar lösningsmedelskoncentration.

38. Kvantifieringen av [^{3} H]-17β-estradiol bunden till hrERα, efter separation av [^{3} H]-17β-estradiol bunden till hrERα från fri [^{3} H]-17β-estradiol genom tillsats av 100 µl av iskall DCC-suspension till varje brunn, bör sedan utföras enligt instruktioner för mättnadsbindningstestet, i punkterna 21–23 i tillägg 3.

39. Brunnarna G10–12 och H10–12 (identifierade som blankprov [för radioaktiv märkning] i tabell 4) anger dpm för [^{3} H]-inmärkt estradiol i 10 µl. Dosen om 10 µl bör överföras direkt till scintillationsvätskan.

Acceptanskriterier

Mättnadsbindningstest

40. Den specifika bindningskurvan bör nå en platå med ökande koncentrationer av [^{3} H]-17β-estradiol, indikerande mättnad av hrERα med ligand.

41. Den specifika bindningen vid 0,5 nM av [³H]-17β-estradiol bör vara inom acceptansintervallet 30–50 % för genomsnittet av uppmätt total tillsatt radioaktivitet från de olika testomgångarna. Enstaka mindre avvikelser utanför detta intervall kan godtas, men om testomgångar konsekvent faller utanför intervallet eller om en viss omgång signifikant faller utanför intervallet bör proteinkoncentrationen justeras och mättnadstestet upprepas.
42. Data bör bilda ett linjärt Scatchard-diagram.
43. Den icke-specifika bindningen bör inte vara överdrivet stor. Storleken på den icke-specifika bindningen bör normalt vara < 35 % av den totala bindningen. Men kvoten kan emellanåt överskrida denna gräns vid mätningar av mycket låga dpm-tal för den lägsta koncentrationen av testad radioaktivt inmärkt 17β-estradiol.

Kompetitiv bindningstest

44. Ökande koncentrationer av ej inmärkt 17β-estradiol bör tränga bort [³H]-17β-estradiol från receptorn på ett sätt som överensstämmer med kompetitiv bindning till en bindningsplats.
45. Den hämmande koncentrationen, IC₅₀, för referensöstrogenet (dvs. 17β-estradiol) bör ungefär motsvara den molära koncentrationen för [³H]-17β-estradiol plus K_d-värdet, som fastställts vid mättnadsbindningstestet.
46. Den totala specifika bindningen bör genomgående hamna inom acceptansintervallet på 40 ± 10 % när den genomsnittliga uppmätta totala radioaktiva koncentrationen, som har tillsatts till varje brunn, har varit 0,5 nM vid flera testomgångar. Enstaka mindre avvikelser utanför detta intervall kan godtas, men om testomgångar konsekvent faller utanför intervallet eller om en viss omgång signifikant hamnar utanför intervallet bör proteinkoncentrationen justeras.
47. Lösningsmedlet bör inte påverka vare sig testets känslighet eller reproducerbarhet. Resultaten för Lösningsmedelskontrollen (TB-brunnar) jämförs med buffertkontrollen för att säkerställa att det valda Lösningsmedlet inte påverkar testsystemet. Om Lösningsmedlet inte har någon effekt på testet bör resultaten för TB och buffertkontroll vara jämförbara.
48. Icke-bindaren bör inte tränga bort mer än 25 % av [³H]-17β-estradiolen från hrERα när den testas upp till 10⁻³ M (OTES) eller 10⁻⁴ M (DBP).
49. Prestandakriterier utarbetades för referensöstrogenet och två svaga bindare (t.ex. noretynodrel, noretindron) med hjälp av data från valideringsstudien av CERI-hrER-bindningstestet (bilaga N i referens 2). I valideringsstudien uppges 95-procentiga konfidensintervall för genomsnittet ± SD (n) för de deltagande fyra laboratoriernas alla kontrollomgångar. De 95-procentiga konfidensintervallen beräknades för kurvanpassningsparametrarna (dvs. topp, botten, Hill-koefficient [Hill slope], log[IC₅₀]-värde) för referensöstrogenet och de svaga bindarna, och log₁₀RBA-värdet för de svaga bindarna jämförda med referensöstrogenet. Tabell 1 anger förväntade intervall för kurvanpassningsparametrarna, vilka kan användas som prestandakriterier. I praktiken kan intervallet för IC₅₀ variera något med det experimentellt erhållna K_d-värdet för den receptorberedning och ligandkoncentration som använts i testet.

50. Inga prestandakriterier för testkemikaliernas kurvanpassningsparametrar utarbetades på grund av den stora mängden möjliga testkemikalier och deras variation i möjliga affiniteter och utfall (t.ex. fullständig kurva, delkurva, ingen kurvanpassning). Men yrkesmässigt omdöme ska tillämpas vid granskning av resultaten från en testkemikalies alla testomgångar. Vidare ska man använda ett tillräckligt intervall av testkemikaliekoncentration för att klart kunna beskriva toppen (t.ex. 90–100 % bindning) på den kompetitiva bindningskurvan. Variationen mellan replikat vid varje koncentration av testkemikalie, liksom mellan de tre oberoende testomgångarna, ska vara rimlig och vetenskapligt försvarbar. Kontroller från en testkemikalies alla testomgångar bör hålla sig nära de prestandamätningar som har rapporterats för detta CERI-test och överensstämma med historiska kontrolldata från respektive laboratorium.

DATAANALYS

Mättnadsbindningstest

51. Både total och icke-specifik bindning mäts. Från dessa värden beräknas specifik bindning av ökande koncentrationer av [^3H]-17 β -estradiol under jämviktsförhållanden genom att subtrahera icke-specifik från total. Ett diagram över specifik bindning mot [^3H]-17 β -estradiol-koncentration bör nå en plåtå för maximal specifik bindning, vilken indikerar ett hrER α mättat av [^3H]-17 β -estradiol. Dessutom bör dataanalysen klargöra inbindning av [^3H]-17 β -estradiol till en enda bindningsplats med hög affinitet. Icke-specifik, total och specifik bindning bör illustreras med en mättnadsbindningskurva. Vidare analys av dessa data bör använda sig av icke-linjär regressionsanalys (t.ex. BioSoft, McPherson, 1985, Motulsky, 1995) med en slutlig dataredovisning i form av ett Scatchard-diagram.
52. Dataanalysen bör fastställa Bmax och Kd enbart utifrån totala bindningsdata, med antagandet att den icke-specifika bindningen är linjär, om inte en motivering ges för att använda en annan metod. Dessutom ska robust regression användas i fastställande av bästa anpassning, om inte annat val motiveras. Val av robust regressionsmetod ska anges. Korrigering för liganduttömning (t.ex. med hjälp av Swillens metod 1995) bör alltid användas i fastställande av Bmax och Kd utifrån mättnadsbindningsdata.

Kompetitivt bindningstest

53. Kurvan över kompetitiv bindning ritas som specifik [^3H]-17 β -estradiol-bindning mot koncentrationen av konkurrerande ligand (log10-enheter). Den koncentration av testkemikalie som hämmar 50 % av den maximala specifika [^3H]-17 β -estradiol-bindningen är IC₅₀-värdet.
54. Uppskattningar av log(IC₅₀)-värden för de positiva kontrollerna (t.ex. referensöstroger och svag bindare) ska fastställas med hjälp av lämplig programvara för icke-linjär kurvanpassning så att de passar en fyraparameters Hill-ekvation (t.ex. BioSoft, McPherson, 1985, Motulsky, 1995). Kurvans topp, botten, lutning och log(IC₅₀)-värde ska i allmänhet lämnas utan restriktion (unconstrained) vid anpassning av dessa kurvor. Robust regression ska användas i fastställande av bästa anpassning, om inte annat val motiveras. Ingen korrigering för liganduttömning ska göras. Efter inledande analys ska varje bindningskurva

granskas för att säkerställa korrekt anpassning till modellen. Den svaga bindarens relativa bindningsaffinitet (RBA) beräknas som procentuell andel av dess $\log(\text{IC}_{50})$ -värde i förhållande till 17 β -estradiols $\log(\text{IC}_{50})$ -värde. Resultat från de positiva kontrollerna och den icke-bindande kontrollen ska utvärderas genom att använda måtten på testprestanda i punkterna 44–49 i detta tillägg 3.

55. Data för alla testkemikalier ska analyseras med en stegvis strategi för att säkerställa att data analyseras korrekt och att varje kurva för kompetitiv bindning klassificeras korrekt. Det är lämpligt att en testkemikalies alla testomgångar initialt underkastas en standardiserad dataanalys som är identisk med den som använts för referensöstroger och kontroller med svaga bindare (se punkt 54 i detta tillägg 3). När den är klar bör en teknisk granskning av kurvanpassningsparametrarna göras, liksom en visuell granskning av hur väl data stämmer med den genererade kurvan över kompetitiv bindning, för varje testomgång. Under denna tekniska granskning är följande iakttagelser goda indikationer på att testet och dataanalyserna har genomförts korrekt: en koncentrationsberoende minskning i procentuell, specifikt bunden [^3H]-17 β -estradiol, låg variation mellan de tekniska replikaten för varje kemisk koncentration och överensstämmelse mellan anpassningsparametrarna från de tre testomgångarna.

Tolkning av data

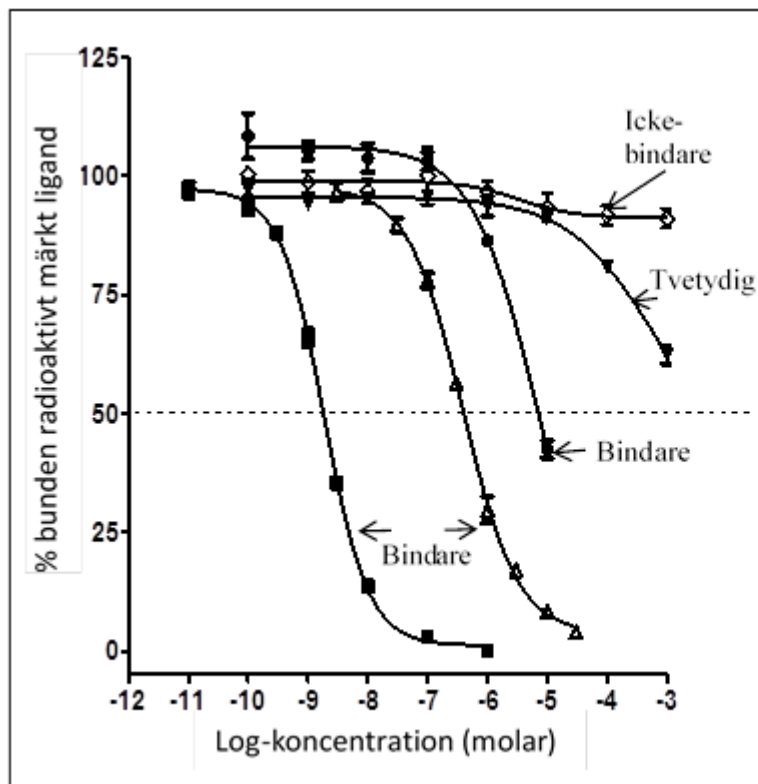
56. Förutsatt att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses en testkemikalie binda till hrER α om data kan anpassas till en bindningskurva och den lägsta punkten på responskurvan, inom dataintervallet, är mindre än 50 % (figur 1).
57. Förutsatt att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda, anses en testkemikalie inte binda till hrER α om
- data kan anpassas till en bindningskurva och den lägsta punkten på responskurvan, inom dataintervallet, är över 75 %, eller
 - data inte kan anpassas till en bindningskurva och den lägsta, outjämnade genomsnittliga procentuella bindningen inom datamängdens koncentrationsgrupper är över 75 %.
58. Testkemikalier anses tvetydiga om inget av villkoren ovan uppfylls (t.ex. den lägsta punkten på den anpassade responskurvan ligger mellan 76 % och 51 %).

Tabell 7: Kriterier för klassificering utifrån en testkemikalies kurva över kompetitiv bindning.

Klassificering	Kriterier
Bindare ^a	Data kan anpassas till en bindningskurva. • Den lägsta punkten på responskurvan, inom dataintervallet, är mindre än 50 %.
Icke-bindare ^b	Om data kan anpassas till en bindningskurva • och den lägsta punkten på den anpassade responskurvan, inom dataintervallet, är över 75 %. Om data inte kan anpassas till en bindningskurva • och den lägsta, outjämnade genomsnittliga procentuella bindningen

	inom datamängdens koncentrationsgrupper är över 75 %.
Tvetydig ^c	Varje mätbar testomgång som varken är en bindare eller en icke-bindare (t.ex. den lägsta punkten längs den anpassade kurvan ligger mellan 76–51 %).

Figur 1: Exempel på klassificeringar av testkemikalier med hjälp av kurva för kompetitiv bindning.



59. Flera testomgångar genomförda med en viss testkemikalie, i samma laboratorium, kombineras genom att tilldela numeriska värden till varje testomgång och ta fram ett medelvärde enligt tabell 8. Resultaten för de kombinerade testomgångarna inom varje laboratorium jämförs med den förväntade klassificeringen för varje testkemikalie.

Tabell 8: Metod för klassificering av testkemikalier med användning av flera testomgångar inom ett laboratorium

Tilldelning av numeriska värden för enskilda testomgångar:	
Klassificering	Numeriskt värde
Bindare	2
Tvetydig	1
Icke-bindare	0
Klassificering av genomsnittligt numeriskt värde vid flera testomgångar:	
Klassificering	Numeriskt värde
Bindare	Genomsnitt $\geq 1,5$
Tvetydig	$0,5 \leq \text{Genomsnitt} < 1,5$
Icke-bindare	Genomsnitt $< 0,5$

TESTRAPPORT

60. Se punkt 24 i ”hrER-BINDNINGSTESTETS DELAR” i denna testmetod.

Tillägg 3.1

TERMER

[³H]E2: 17 β -estradiol radioaktivt inmärkt med tritium.

DCC: Dextran-täckt träkol (Dextran-Coated Charcoal).

E2: Ej inmärkt 17 β -estradiol (inert).

Testbuffert: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, innehållande 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO₃, 10 % glycerol, 0,2 mM leupeptin, 1 mM ditiotreitol och 10 mg/ml bovint serumalbumin.

hrER α : Human rekombinant östrogenreceptor alfa (ligandbindande domän).

Replikat: En av flera brunnar med samma innehåll och koncentrationer vilka testas parallellt inom en enskild testomgång. I detta protokoll testas varje koncentration av testkemikalie i tripletter, det betyder att tre replikat testas samtidigt vid varje koncentration av testkemikalie.

Testomgång: En fullständig uppsättning av parallellt hanterade brunnar i mikrotiterplattor, vilka ger all nödvändig information för att karakterisera en testkemikalies bindning till hrER α (dvs. totalt [³H]-17 β -estradiol tillsatt till testbrunnen, maximal bindning hos [³H]-17 β -estradiol till hrER α , icke-specifik bindning och total bindning vid olika koncentrationer av testkemikalie). En testomgång kan bestå av så lite som en testbrunn (dvs. ett replikat) per koncentration, men eftersom protokollet kräver tripletter, består en omgång av tre testbrunnar per koncentration. Dessutom kräver detta protokoll tre oberoende (dvs. icke-parallella) testomgångar per kemikalie.

Tillägg 3.2

UPPLÄGG FÖR BRUNNAR TILL TEST AV KOMPETITIV BINDNING

Platta	Position	Replik	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentra- tionskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER- stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spärsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentra- tion av konkurr- erande ligand (M)
Fast	A1	1	Blankprov	BK	BK1	–	–	–	–	–	–	–
Fast	A2	2	Blankprov	BK	BK2	–	–	–	–	–	–	–
Fast	A3	3	Blankprov	BK	BK3	–	–	–	–	–	–	–
Fast	B1	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S1	$1,00 \times 10^{-10}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-11}$
Fast	B2	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S1	$1,00 \times 10^{-10}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-11}$
Fast	B3	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S1	$1,00 \times 10^{-10}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-11}$
Fast	C1	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S2	$1,00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-10}$
Fast	C2	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S2	$1,00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-10}$
Fast	C3	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S2	$1,00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-10}$
Fast	D1	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S3	$3,16 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$3,2 \times 10^{-10}$
Fast	D2	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S3	$3,16 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$3,2 \times 10^{-10}$
Fast	D3	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S3	$3,16 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$3,2 \times 10^{-10}$
Fast	E1	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S4	$1,00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-9}$
Fast	E2	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S4	$1,00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-9}$
Fast	E3	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S4	$1,00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-9}$
Fast	F1	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S5	$3,16 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$3,2 \times 10^{-9}$
Fast	F2	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S5	$3,16 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$3,2 \times 10^{-9}$
Fast	F3	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S5	$3,16 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$3,2 \times 10^{-9}$
Fast	G1	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S6	$1,00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-8}$
Fast	G2	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S6	$1,00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-8}$
Fast	G3	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S6	$1,00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-8}$
Fast	H1	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S7	$1,00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-7}$
Fast	H2	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S7	$1,00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-7}$
Fast	H3	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S7	$1,00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-7}$
Fast	A4	1	Noretynodrel	NE	WP1	$1,00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-9}$
Fast	A5	2	Noretynodrel	NE	WP1	$1,00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-9}$
Fast	A6	3	Noretynodrel	NE	WP1	$1,00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-9}$
Fast	B4	1	Noretynodrel	NE	WP2	$1,00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-8}$
Fast	B5	2	Noretynodrel	NE	WP2	$1,00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-8}$
Fast	B6	3	Noretynodrel	NE	WP2	$1,00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-8}$
Fast	C4	1	Noretynodrel	NE	WP3	$3,16 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$3,2 \times 10^{-8}$
Fast	C5	2	Noretynodrel	NE	WP3	$3,16 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$3,2 \times 10^{-8}$
Fast	C6	3	Noretynodrel	NE	WP3	$3,16 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$3,2 \times 10^{-8}$
Fast	D4	1	Noretynodrel	NE	WP4	$1,00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-7}$
Fast	D5	2	Noretynodrel	NE	WP4	$1,00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-7}$
Fast	D6	3	Noretynodrel	NE	WP4	$1,00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-7}$
Fast	E4	1	Noretynodrel	NE	WP5	$3,16 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$3,2 \times 10^{-7}$
Fast	E5	2	Noretynodrel	NE	WP5	$3,16 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$3,2 \times 10^{-7}$
Fast	E6	3	Noretynodrel	NE	WP5	$3,16 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$3,2 \times 10^{-7}$
Fast	F4	1	Noretynodrel	NE	WP6	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
Fast	F5	2	Noretynodrel	NE	WP6	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
Fast	F6	3	Noretynodrel	NE	WP6	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
Fast	G4	1	Noretynodrel	NE	WP7	$3,16 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$3,2 \times 10^{-6}$
Fast	G5	2	Noretynodrel	NE	WP7	$3,16 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$3,2 \times 10^{-6}$
Fast	G6	3	Noretynodrel	NE	WP7	$3,16 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$3,2 \times 10^{-6}$

Upplägg för brunnar till test av kompetitiv bindning												
Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	InER-stamlösning (µl)	Buffervolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
Fast	H4	1	Noretynodrel	NE	WP8	$3,16 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$3,2 \times 10^{-5}$
Fast	H5	2	Noretynodrel	NE	WP8	$3,16 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$3,2 \times 10^{-5}$
Fast	H6	3	Noretynodrel	NE	WP8	$3,16 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$3,2 \times 10^{-5}$
Fast	A7	1	OTES	N	OTES1	$1,00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-10}$
Fast	A8	2	OTES	N	OTES1	$1,00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-10}$
Fast	A9	3	OTES	N	OTES1	$1,00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-10}$
Fast	B7	1	OTES	N	OTES2	$1,00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-9}$
Fast	B8	2	OTES	N	OTES2	$1,00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-9}$
Fast	B9	3	OTES	N	OTES2	$1,00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-9}$
Fast	C7	1	OTES	N	OTES3	$1,00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-8}$
Fast	C8	2	OTES	N	OTES3	$1,00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-8}$
Fast	C9	3	OTES	N	OTES3	$1,00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-8}$
Fast	D7	1	OTES	N	OTES4	$1,00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-7}$
Fast	D8	2	OTES	N	OTES4	$1,00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-7}$
Fast	D9	3	OTES	N	OTES4	$1,00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-7}$
Fast	E7	1	OTES	N	OTES5	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
Fast	E8	2	OTES	N	OTES5	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
Fast	E9	3	OTES	N	OTES5	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
Fast	F7	1	OTES	N	OTES6	$1,00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-5}$
Fast	F8	2	OTES	N	OTES6	$1,00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-5}$
Fast	F9	3	OTES	N	OTES6	$1,00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-5}$
Fast	G7	1	OTES	N	OTES7	$1,00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-4}$
Fast	G8	2	OTES	N	OTES7	$1,00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-4}$
Fast	G9	3	OTES	N	OTES7	$1,00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-4}$
Fast	H7	1	OTES	N	OTES8DBP7	$1,00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-3}$
Fast	H8	2	OTES	N	OTES88	$1,00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-3}$
Fast	H9	3	OTES	N	OTES8	$1,00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-3}$
Fast	A10	1	Total bindning	TB	TB1	–	30	60	10	–	100	–
Fast	A11	2	Total bindning	TB	TB2	–	30	60	10	–	100	–
Fast	A12	3	Total bindning	TB	TB3	–	30	60	10	–	100	–
Fast	B10	4	Total bindning	TB	TB4	–	30	60	10	–	100	–
Fast	B11	5	Total bindning	TB	TB5	–	30	60	10	–	100	–
Fast	B12	6	Total bindning	TB	TB6	–	30	60	10	–	100	–
Fast	C10	1	Icke-radioaktiv	NSB	S1	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
Fast	C11	2	Icke-radioaktiv	NSB	S2	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
Fast	C12	3	Icke-radioaktiv	NSB	S3	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
Fast	D10	4	Icke-radioaktiv	NSB	S4	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
Fast	D11	5	Icke-radioaktiv	NSB	S5	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
Fast	D12	6	Icke-radioaktiv	NSB	S6	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
Fast	E10	1	Buffertkontroll	BC	BC1	–	–	100	–	–	100	–
Fast	E11	2	Buffertkontroll	BC	BC2	–	–	100	–	–	100	–
Fast	E12	3	Buffertkontroll	BC	BC3	–	–	100	–	–	100	–
Fast	F10	4	Buffertkontroll	BC	BC4	–	–	100	–	–	100	–
Fast	F11	5	Buffertkontroll	BC	BC5	–	–	100	–	–	100	–
Fast	F12	6	Buffertkontroll	BC	BC6	–	–	100	–	–	100	–
Fast	G10*	1	Blankprov (för	Radioaktiv	H1	–	90	–	10	–	100	–
Fast	G11*	2	Blankprov (för	Radioaktiv	H2	–	90	–	10	–	100	–
Fast	G12*	3	Blankprov (för	Radioaktiv	H3	–	90	–	10	–	100	–
Fast	H10*	4	Blankprov (för	Radioaktiv	H4	–	90	–	10	–	100	–

Fast	H11*	5	Blankprov (för	Radioaktiv	H5	–	90	–	10	–	100	–
Fast	H12	6	Blankprov (för	Radioaktiv	H6	–	90	–	10	–	100	–
			radioaktiv									
			märkning)									

* Obs: brunnarna som märkts med "radioaktiv" är tomma under inkubationen. Dessa 10 µl tillsätts endast i scintillationsräkningssyfte.

Upplägg för brunnar till test av kompetitiv bindning												
Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentra- tionskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER- stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym av spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurr- erande ligand (M)
P1	A1	1	Okänd 1	U1	1	$1,00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-10}$
P1	A2	2	Okänd 1	U1	1	$1,00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-10}$
P1	A3	3	Okänd 1	U1	1	$1,00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-10}$
P1	B1	1	Okänd 1	U1	2	$1,00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-9}$
P1	B2	2	Okänd 1	U1	2	$1,00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-9}$
P1	B3	3	Okänd 1	U1	2	$1,00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-9}$
P1	C1	1	Okänd 1	U1	3	$1,00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-8}$
P1	C2	2	Okänd 1	U1	3	$1,00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-8}$
P1	C3	3	Okänd 1	U1	3	$1,00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-8}$
P1	D1	1	Okänd 1	U1	4	$1,00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-7}$
P1	D2	2	Okänd 1	U1	4	$1,00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-7}$
P1	D3	3	Okänd 1	U1	4	$1,00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-7}$
P1	E1	1	Okänd 1	U1	5	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	E2	2	Okänd 1	U1	5	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	E3	3	Okänd 1	U1	5	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	F1	1	Okänd 1	U1	6	$1,00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-5}$
P1	F2	2	Okänd 1	U1	6	$1,00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-5}$
P1	F3	3	Okänd 1	U1	6	$1,00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-5}$
P1	G1	1	Okänd 1	U1	7	$1,00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-4}$
P1	G2	2	Okänd 1	U1	7	$1,00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-4}$
P1	G3	3	Okänd 1	U1	7	$1,00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-4}$
P1	H1	1	Okänd 1	U1	8	$1,00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-3}$
P1	H2	2	Okänd 1	U1	8	$1,00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-3}$
P1	H3	3	Okänd 1	U1	8	$1,00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-3}$
P1	A4	1	Okänd 2	U2	1	$1,00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-10}$
P1	A5	2	Okänd 2	U2	1	$1,00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-10}$
P1	A6	3	Okänd 2	U2	1	$1,00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-10}$
P1	B4	1	Okänd 2	U2	2	$1,00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-9}$
P1	B5	2	Okänd 2	U2	2	$1,00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-9}$
P1	B6	3	Okänd 2	U2	2	$1,00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-9}$
P1	C4	1	Okänd 2	U2	3	$1,00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-8}$
P1	C5	2	Okänd 2	U2	3	$1,00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-8}$
P1	C6	3	Okänd 2	U2	3	$1,00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-8}$
P1	D4	1	Okänd 2	U2	4	$1,00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-7}$
P1	D5	2	Okänd 2	U2	4	$1,00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-7}$
P1	D6	3	Okänd 2	U2	4	$1,00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-7}$
P1	E4	1	Okänd 2	U2	5	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	E5	2	Okänd 2	U2	5	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	E6	3	Okänd 2	U2	5	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	F4	1	Okänd 2	U2	6	$1,00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-5}$
P1	F5	2	Okänd 2	U2	6	$1,00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-5}$
P1	F6	3	Okänd 2	U2	6	$1,00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-5}$
P1	G4	1	Okänd 2	U2	7	$1,00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-4}$
P1	G5	2	Okänd 2	U2	7	$1,00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-4}$
P1	G6	3	Okänd 2	U2	7	$1,00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-4}$
P1	H4	1	Okänd 2	U2	8	$1,00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-3}$
P1	H5	2	Okänd 2	U2	8	$1,00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-3}$
P1	H6	3	Okänd 2	U2	8	$1,00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-3}$

Upplägg för brunnar till test av kompetitiv bindning

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentra- tionskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER- stamlösning (µl)	Buffervolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurr- erande ligand (M)
P1	A7	1	Okänd 3	U3	1	$1,00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-10}$
P1	A8	2	Okänd 3	U3	1	$1,00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-10}$
P1	A9	3	Okänd 3	U3	1	$1,00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-10}$
P1	B7	1	Okänd 3	U3	2	$1,00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-9}$
P1	B8	2	Okänd 3	U3	2	$1,00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-9}$
P1	B9	3	Okänd 3	U3	2	$1,00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-9}$
P1	C7	1	Okänd 3	U3	3	$1,00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-8}$
P1	C8	2	Okänd 3	U3	3	$1,00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-8}$
P1	C9	3	Okänd 3	U3	3	$1,00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-8}$
P1	D7	1	Okänd 3	U3	4	$1,00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-7}$
P1	D8	2	Okänd 3	U3	4	$1,00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-7}$
P1	D9	3	Okänd 3	U3	4	$1,00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-7}$
P1	E7	1	Okänd 3	U3	5	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	E8	2	Okänd 3	U3	5	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	E9	3	Okänd 3	U3	5	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	F7	1	Okänd 3	U3	6	$1,00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-5}$
P1	F8	2	Okänd 3	U3	6	$1,00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-5}$
P1	F9	3	Okänd 3	U3	6	$1,00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-5}$
P1	G7	1	Okänd 3	U3	7	$1,00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-4}$
P1	G8	2	Okänd 3	U3	7	$1,00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-4}$
P1	G9	3	Okänd 3	U3	7	$1,00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-4}$
P1	H7	1	Okänd 3	U3	8	$1,00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-3}$
P1	H8	2	Okänd 3	U3	8	$1,00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-3}$
P1	H9	3	Okänd 3	U3	8	$1,00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-3}$
P1	A10	1	Kontroll E2 (max)	Fast	E2max1	$1,00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,00 \times 10^{-7}$
P1	A11	2	Kontroll E2 (max)	Fast	E2max2	$1,00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,00 \times 10^{-7}$
P1	A12	3	Kontroll E2 (max)	Fast	E2max3	$1,00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1,00 \times 10^{-7}$
P1	B10	1	Kontroll E2	Fast	E2IC ₅₀ 1	$E2IC_{50} \times 10$	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	B11	2	Kontroll E2	Fast	E2IC ₅₀ 2	$E2IC_{50} \times 10$	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	B12	3	Kontroll E2	Fast	E2IC ₅₀ 3	$E2IC_{50} \times 10$	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	C10	1	Kontroll NE	Fast	Nemax1	$1,00 \times 10^{-3,5}$	30	50	10	10	100	$1,00 \times 10^{-4,5}$
P1	C11	2	Kontroll NE	Fast	Nemax2	$1,00 \times 10^{-3,5}$	30	50	10	10	100	$1,00 \times 10^{-4,5}$
P1	C12	3	Kontroll NE	Fast	Nemax3	$1,00 \times 10^{-3,5}$	30	50	10	10	100	$1,00 \times 10^{-4,5}$
P1	D10	1	Kontroll NE	Fast	NEIC ₅₀ 1	$NEIC_{50} \times 10$	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	D11	2	Kontroll NE	Fast	NEIC ₅₀ 2	$NEIC_{50} \times 10$	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	D12	3	Kontroll NE	Fast	NEIC ₅₀ 3	$NEIC_{50} \times 10$	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	E10	1	Icke-radioaktiv E2	NSB	S1	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	E11	2	Icke-radioaktiv E2	NSB	S2	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	E12	3	Icke-radioaktiv E2	NSB	S3	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	F10	4	Icke-radioaktiv E2	NSB	S4	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	F11	5	Icke-radioaktiv E2	NSB	S5	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	F12	6	Icke-radioaktiv E2	NSB	S6	$1,00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0 \times 10^{-6}$
P1	G10	1	Total bindning	TB	TB1	–	30	60	10	–	100	–
P1	G11	2	Total bindning	TB	TB2	–	30	60	10	–	100	–
P1	G12	3	Total bindning	TB	TB3	–	30	60	10	–	100	–
P1	H10	4	Total bindning	TB	TB4	–	30	60	10	–	100	–
P1	H11	5	Total bindning	TB	TB5	–	30	60	10	–	100	–
P1	H12	6	Total bindning	TB	TB6	–	30	60	10	–	100	–

Tillägg 4

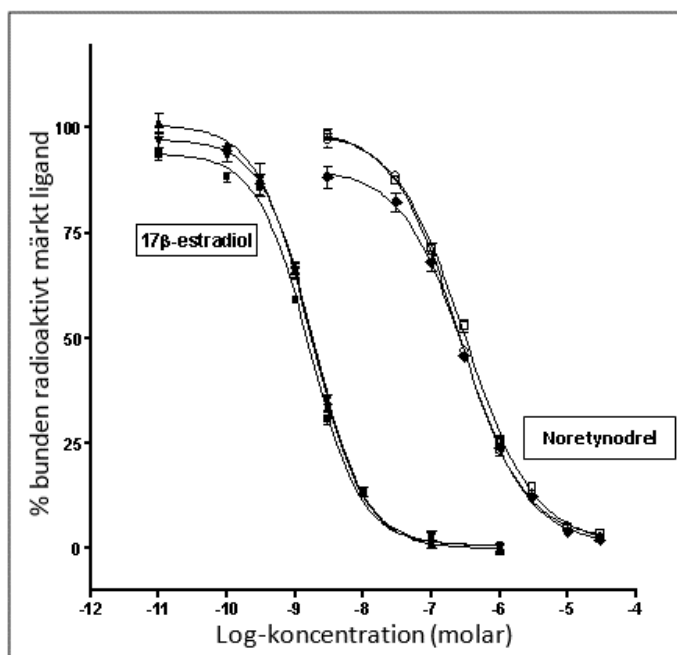
ÖVERVÄGANDEN INFÖR ANALYS AV DATA FRÅN KOMPETITIVT BINDNINGSTEST FÖR HRER

1. Det kompetitiva bindningstestet för hrER α mäter bindningen av [^3H]-17 β -estradiol vid en viss koncentration i närvaro av ökande koncentrationer av en testkemikalie. Kurvan över kompetitiv bindning ritas som specifik [^3H]-17 β -estradiol-bindning mot koncentrationen av konkurrerande ligand (log₁₀-enheter). Den koncentration av testkemikalie som hämmar 50 % av den maximala specifika [^3H]-17 β -estradiol-bindningen är IC₅₀.

Analys av data för referensöstrogen och svag bindare (1)

2. Data från kontrollomgångarna omvandlas (dvs. procentuell, specifik [^3H]-17 β -estradiol-bindning och log-koncentrationen av kontrollkemikalien) för vidare analys. Uppskattningar av log(IC₅₀)-värden för de positiva kontrollerna (t.ex. referensöstrogen och svag bindare) ska fastställas med hjälp av lämplig programvara för icke-linjär kurvanpassning så att de passar en fyraparameters Hill-ekvation (t.ex. BioSoft, GraphPad Prism) (2). Kurvans topp, botten, lutning och log(IC₅₀)-värde kan i allmänhet lämnas utan restriktion (unconstrained) vid anpassning av dessa kurvor. Robust regression ska användas i fastställande av bästa anpassning, om inte annat val motiveras. Val av robust regressionsmetod ska anges. Korrigering av liganduttömning behövdes inte för FW- eller CERI-hrER-tester, men kan vid behov övervägas. Efter inledande analys ska varje bindningskurva granskas för att säkerställa korrekt anpassning till modellen. Den svaga bindarens relativa bindningsaffinitet (RBA) kan beräknas procentuellt som dess log(IC₅₀)-värde i förhållande till log(IC₅₀)-värdet för 17 β -estradiol. Resultat för de positiva kontrollerna och den icke-bindande kontrollen bör utvärderas med mått på testprestanda och acceptanskriterier som beskrivits i denna testmetod (punkt 20), tillägg 2 (FW-test, punkterna 41–51) och tillägg 3 (CERI-test, punkterna 41–51). Exempel på 3 testomgångar för referensöstrogen och svag bindare visas i figur 1.

Figur 1. Exempel på kurvor över kompetitiv bindning för referensöstrogen och kontrollen med svag bindare.

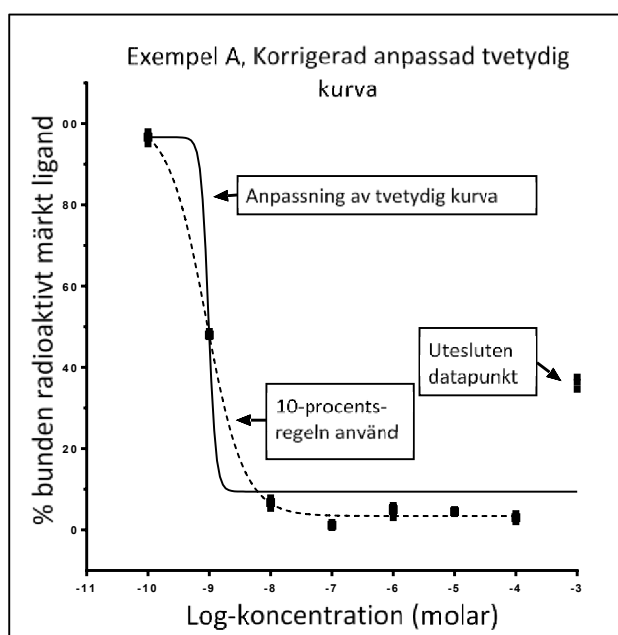


Dataanalys för testkemikalier

3. Data för alla testkemikalier ska analyseras med en stegvis strategi för att säkerställa att data analyseras korrekt och att varje kurva för kompetitiv bindning klassificeras korrekt. Det är lämpligt att en testkemikalies alla testomgångar initialt underkastas en standardiserad dataanalys som är identisk med den som använts för referensöstrogen och kontroller med svaga bindare. När den är klar bör en teknisk granskning av kurvanpassningsparametrarna göras, liksom en visuell granskning av hur väl data stämmer med den genererade kurvan över kompetitiv bindning, för varje testomgång. Under denna tekniska granskning är följande iakttagelser goda indikationer på att testet och dataanalyserna har genomförts korrekt: en koncentrationsberoende minskning i procentuell, specifikt bunden [^3H]- 17β -estradiol, låg variation mellan de tekniska replikaten för varje kemisk koncentration och överensstämmelse mellan anpassningsparametrarna från de tre testomgångarna. Yrkesmässigt omdöme ska tillämpas vid granskning av resultaten från en testkemikalies alla testomgångar och de data som används för att klassificera respektive testkemikalie som bindare eller icke-bindare ska vara vetenskapligt försvarbara.
4. Emellanåt kan det finnas data som kräver ytterligare beaktande för att man ska kunna analysera och tolka hrER-bindningsdata korrekt. Olika studier har uppvisat fall där analys och tolkning av kompetitiva receptorbindningsdata kan kompliceras av en uppgång i procentuell specifik bindning när kemikalier testas vid sina högsta koncentrationer (figur 2). Detta är ett välkänt fenomen som har påträffats vid användning av protokoll för ett antal olika kompetitiva receptorbindningstester (3). I dessa fall observeras en

koncentrationsberoende respons vid lägre koncentrationer, men när testkemikaliens koncentration närmar sig löslighetsgränsen minskar inte längre bortträngningen av [^3H]-17 β -estradiol. I dessa fall indikerar data för de högre koncentrationerna att man har nått testets biologiska gräns. Till exempel är detta fenomen många gånger förknippat med kemisk olöslighet och utfällning vid höga koncentrationer, alternativt återspeglar det att man har överskridit det dextran-täckta träkolets förmåga att binda den icke-bundna, radioaktivt inmärkt liganden under separationssteget, vid den högsta kemiska koncentrationen. Att lämna kvar sådana datapunkter vid anpassning av kompetitiva bindningsdata till en sigmoidal kurva kan ibland leda till en felklassificering av testkemikaliens ER-bindningspotential (figur 2). För att undvika detta ingår det i FW- och CERI-hrER-bindningstesterna en möjlighet att från analyserna utesluta datapunkter där genomsnittet av replikaten för procentuell, specifikt bunden [^3H]-17 β -estradiol är 10 % eller mer över det observerade medelvärde vid en lägre koncentration (detta omtalas ofta som 10-procentsregeln). Denna regel kan endast användas en gång för varje enskild kurva, och det måste finnas kvar data från minst sex koncentrationer för att kurvan ska kunna klassificeras korrekt.

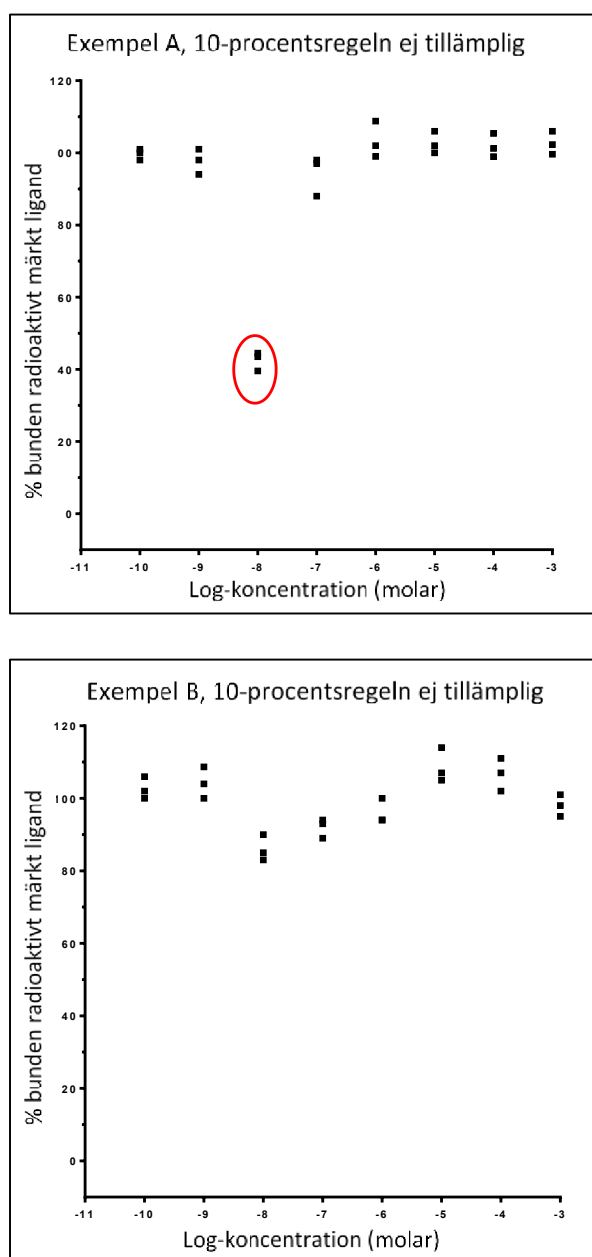
Figur 2. Exempel på kompetitiva bindningskurvor med och utan användning av 10-procentsregeln



5. Lämplig användning av 10-procentsregeln för att korrigera dessa kurvor ska övervägas noga och förbehållas de fall där det finns starka indikationer på att ämnet är en hrER-bindare. I samband med utförande av experimenten för valideringsstudien av FW-hrER-bindningstestet noterade att 10-procentsregeln ibland ledde till en oavsiktlig och oförutsedd konsekvens. Kemikalier som inte interagerade med receptorn (dvs. faktiska icke-bindare) visade ofta en variation runt 100 % bunden radioaktivt märkt ligand som var större än 10 % över det testade koncentrationsintervallet. Om det lägsta värdet råkade vara

vid en låg koncentration riskerade data från alla högre koncentrationer att uteslutas från analysen genom användning av 10-procentsregeln, även om dessa koncentrationer kunde vara användbara för att fastställa att kemikalien är en icke-bindare. Figur 3 visar exempel där det är olämpligt att använda 10-procentsregeln.

Figur 3. Exempel, kompetitiva bindningsdata där det är olämpligt att använda 10-procentsregeln.



Litteratur

- (1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.
- (2) Motulsky H. och Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, I: Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, s. 187-191. www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf
- (3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.