



Rådet for
Den Europæiske Union

Bruxelles, den 25. februar 2019
(OR. en)

6800/19
ADD 2

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

FØLGESKRIVELSE

fra:	Europa-Kommissionen
modtaget:	22. februar 2019
til:	Generalsekretariatet for Rådet
Vedr.:	Bilag til KOMMISSIONENS FORORDNING (EU) .../... af XXX om ændring med henblik på tilpasning til den tekniske udvikling af bilaget til forordning (EF) nr. 440/2008 om fastlæggelse af forsøgsmetoder i henhold til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH)

Hermed følger til delegationerne dokument - Annex to D060575/02.

Bilag: Annex to D060575/02

B.71 IN VITRO HUDSENSIBILISERINGSASSAYS AF DEN CENTRALE BEGIVENHED AKTIVERING AF DENDRITISKE CELLER I ADVERSE OUTCOME PATHWAY (AOP) FOR HUDSENSIBILISERING

GENEREL INDLEDNING

Forsøgsmetode baseret på den centrale begivenhed aktivering af dendritiske celler

1. Et hudsensibiliserende stof er et stof, der inducerer en allergisk reaktion ved hudkontakt som defineret ved De Forenede Nationers globalt harmoniserede system til klassificering og mærkning af kemikalier (UN GHS) (1) og Den Europæiske Unions (EU) forordning nr. 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP-forordningen)¹. Der hersker almindelig enighed om de centrale biologiske begivenheder, der ligger til grund for hudsensibilisering. Den nuværende viden om kemiske og biologiske mekanismer i forbindelse med hudsensibilisering er sammenfattet i en Adverse Outcome Pathway (AOP) under OECD's AOP-program (2) fra den molekylære udløsende begivenhed over de mellemliggende begivenheder til den skadelige virkning, nemlig allergisk kontaktdermatitis. I dette tilfælde er den molekylære udløsende begivenhed (dvs. den første centrale begivenhed) den kovalente binding af elektrofile stoffer til nukleofile centre i hudproteiner. Den anden centrale begivenhed i denne AOP finder sted i keratinocyterne og omfatter inflammatoriske reaktioner samt ændringer i genekspression i tilknytning til specifikke cellesignalveje, f.eks. antioxidant-/elektrofilresponselement (ARE)-afhængige veje. Den tredje centrale begivenhed er aktivering af dendritiske celler, som typisk vurderes ved ekspression af bestemte celleoverflademærkere, kemokiner og cytokiner. Den fjerde centrale begivenhed er T-celleaktivering, som vurderes indirekte ved Local Lymph Node Assay (assay på lokale lymfeknuder – LLNA) i mus (3).
2. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (TG) 442E (2017). Heri beskrives in vitro-assays vedrørende de mekanismer, der er beskrevet under den centrale begivenhed aktivering af dendritiske celler i hudsensibiliserings-AOP'en (2). Denne forsøgsmetode

¹ Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006, EUT L 353 af 31.12.2008.

omfatter test, der anvendes til at underbygge differentieringen mellem hudsensibiliserende og ikke-sensibiliserende stoffer i henhold til UN GHS og CLP.

De test, der er beskrevet i denne forsøgsmetode, er:

- Human Cell Line Activation-test (h-CLAT)
 - U937 cell line activation-test (U-SENS™)
 - Interleukin-8 Reporter Gene Assay (IL-8 Luc assay).
3. De test, der indgår i denne forsøgsmetode og den tilsvarende OECD-testvejledning, kan afvige fra den fremgangsmåde, der anvendes til generering af data, og de målte resultater, men de kan anvendes uden forskel til at opfylde landenes behov for testresultater vedrørende den centrale begivenhed aktivering af dendritiske celler i hudsensibiliserings-AOP'en, samtidig med at de drager fordel af OECD-aftalen om gensidig godkendelse af data.

Baggrund og principper for de test, der indgår i forsøgsmetoden baseret på den centrale begivenhed

4. Vurderingen af hudsensibilisering har typisk omfattet brug af laboratoriedyr. Med de klassiske metoder, der anvender marsvin, Magnusson og Kligmans Guinea Pig Maximisation Test (GPMT) og Buehler-testen (TM B.6 (4)) vurderer man både induktions- og udløsningsfasen ved hudsensibilisering. Musetest, LLNA (TM B.42) (3) og dens to ikke-radioaktive ændringer, LLNA: DA (TM B.50 (5)) og LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (6)) vurderer alle udelukkende induktionsresponsen og er også blevet accepteret, eftersom de indebærer en fordel i forhold til marsvineforsøg, hvad angår dyrevelfærd og en objektiv måling af latenstiden for hudsensibilisering.
5. På det seneste er der blevet indført mekanistisk baserede in chemico- og in vitro-forsøgsmetoder vedrørende den første centrale begivenhed (TM B.59; direkte peptidreaktivitetsassay (DPRA) (7)) og den anden centrale begivenhed (TM B.60; ARE-Nrf2-luciferase-forsøgsmetoden (8)) i hudsensibiliserings-AOP'en som et bidrag til evalueringen af kemikaliers potentielle hudsensibiliseringsfare.
6. De test, der er beskrevet i denne forsøgsmetode, måler enten ændringen i ekspressionen af celleoverflademærker(er), der er knyttet til processen med aktivering af monocytter og dendritiske celler efter eksponering for allergifremkaldende stoffer (f.eks. CD54, CD86), eller ændringer i ekspressionen af IL-8, et cytokin knyttet til aktiveringen af dendritiske celler. Hudsensibiliserende stoffer inducerer angiveligt ekspression af cellemembranmarkører som f.eks. CD40, CD54, CD80, CD83 og CD86 og inducerer desuden proinflammatoriske cytokiner som f.eks. IL-1 β og TNF- α og adskillige

kemokiner, herunder IL-8 (CXCL8) og CCL3 (9) (10) (11) (12), knyttet til aktivering af dendritiske celler (2).

7. Da aktivering af dendritiske celler imidlertid kun udgør en central begivenhed i hudsensibiliserings-AOP'en (2) (13), er den information, der genereres med test, som måler markører for aktivering af dendritiske celler alene, muligvis ikke tilstrækkelig til at drage konklusioner om, hvorvidt kemiske stoffer har et hudsensibiliseringspotentialt eller ej. Derfor skal de data, der genereres med de test, som er beskrevet i denne forsøgsmetode, støtte differentieringen mellem hudsensibiliserende stoffer (dvs. UN GHS-/CLP-kategori 1) og ikke-sensibiliserende stoffer, når de anvendes i en integreret tilgang til testning og vurdering (IATA) sammen med andre relevante supplerende oplysninger fra f.eks. in vitro-assays, der vedrører andre centrale begivenheder i hudsensibiliserings-AOP'en, samt andre metoder end test, herunder analogislutning fra tilsvarende kemikalier (13). Eksempler på anvendelse af data genereret med disse test i definerede tilgange, dvs. tilgange, som er standardiserede både i forhold til den række af informationskilder, der anvendes, og i forhold til den procedure, der anvendes på dataene med henblik på at udlede prognoser, er blevet offentliggjort (13) og kan anvendes som nyttige elementer i IATA.
8. De test, der er beskrevet i denne forsøgsmetode, kan ikke anvendes alene, hverken til at kategorisere hudsensibiliserende stoffer i underkategorierne 1A og 1B som defineret i UN GHS-/CLP, af myndigheder, der anvender disse to valgfrie underkategorier, eller til at forudsige styrken i forbindelse med beslutninger om sikkerhedsvurdering. Afhængigt af den juridiske ramme kan de positive udfald, som disse metoder genererer, imidlertid anvendes alene til at klassificere et kemikalie i UN GHS-/CLP-kategori 1.
9. Betegnelsen "testkemikalie" anvendes i denne forsøgsmetode om det, der testes¹, og vedrører ikke anvendeligheden af test til testning af stoffer med én bestanddel, stoffer med flere bestanddele og/eller blandinger. I øjeblikket foreligger der begrænsede oplysninger om anvendeligheden af test på stoffer med flere bestanddele/blandinger (14) (15). Testene kan ikke desto mindre teknisk set benyttes til stoffer med flere bestanddele og blandinger. Før denne forsøgsmetode anvendes til test af en blanding til generering af data med et lovmæssigt formål, bør det imidlertid overvejes, om den vil give resultater, som er egnede

¹ I juni 2013 blev OECD på et fælles møde enig om, at termen "testkemikalie", hvor det er muligt, bør anvendes på en mere konsekvent måde i nye og opdaterede OECD-testvejledninger til at beskrive det, der testes.

til formålet, og i givet fald hvorfor¹. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om testning af blandingen. Ved test af stoffer med flere bestanddele eller blandinger bør der desuden tages hensyn til cytotoksiske bestanddeles eventuelle interferens med de observerede responser.

¹ Denne sætning blev foreslået og godkendt på WNT-mødet i april 2014.

LITTERATUR

- (1) United Nations (UN) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1
Tilgængelig på:
https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment, No. 168. Tilgængelig på:
[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=E NV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=E NV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En).
- (3) Kapitel B.42 i dette bilag: Assay på lokale lymfeknuder. Kapitel B.6 i dette bilag: Hudsensibilisering.
- (4) Kapitel B.50 i dette bilag: Hudsensibilisering: Assay på lokale lymfeknuder: DA.
- (5) Kapitel B.51 i dette bilag: Hudsensibilisering: Assay på lokale lymfeknuder: BrdU-ELISA.
- (6) Kapitel B.59 i dette bilag: In chemico-hudsensibilisering: direkte peptidreaktivitetsassay (DPRA).
- (7) Kapitel B.60 i dette bilag: In vitro-hudsensibilisering: ARE-Nrf2-luciferase-forsøgsmetoden.
- (8) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-96.
- (9) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL og Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180:1841-7.
- (10) Aiba S, Terunuma A, Manome H og Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031-8.
- (11) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y og Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390-8.

- (12) OECD (2016). Series on Testing and Assessment, No. 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Tilgængelig på: <https://community.oecd.org/community/iatass>.
- (13) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (14) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

Tillæg 1

IN VITRO-HUDSENSIBILISERING: HUMAN CELL LINE ACTIVATION TEST (H-CLAT)

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

1. h-CLAT måler ændringer i ekspressionen af celleoverflademarkører i tilknytning til processen med aktivering af monocytter og dendritiske celler (DC) (dvs. CD86 og CD54) i human monocytisk leukæmi-cellelinjen THP-1 efter eksponering for allergifremkaldende stoffer (1) (2). De målte eksppressionsniveauer for celleoverflademarkørerne CD86 og CD54 anvendes dernæst til støtte for differentieringen mellem hudsensibiliserende stoffer og ikke-sensibiliserende stoffer.
2. h-CLAT er blevet evalueret i en valideringsundersøgelse koordineret af Den Europæiske Unions Referencelaboratorium for Alternativer til Dyreforsøg (EURL ECVAM), og EURL ECVAM's videnskabelige rådgivende udvalg (ESAC) foretog efterfølgende uafhængige peer reviews. På grundlag af al tilgængelig dokumentation og input fra myndigheder og interessenter anbefalede EURL ECVAM (3), at h-CLAT anvendes som en del af en IATA til støtte for differentieringen mellem hudsensibiliserende stoffer og ikke-sensibiliserende stoffer med henblik på fareklassificering og mærkning. Litteraturen indeholder eksempler på anvendelse af h-CLAT-data i kombination med andre oplysninger (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).
3. Det viste sig, at h-CLAT kunne overføres til laboratorier med erfaring inden for celledyrkningsteknikker og flowcytometrianalyse. Graden af reproducerbarhed i de forudsigelser, der kan forventes fra testen, ligger i størrelsesordenen 80 % inden for og mellem laboratorier (3) (12). De resultater, der er blevet genereret i valideringsundersøgelsen (13) og andre offentliggjorte undersøgelser (14), indikerer generelt, at nøjagtigheden af differentieringen mellem hudsensibiliserende stoffer (dvs. UN GHS-/CLP-kategori 1) og ikke-sensibiliserende stoffer i forhold til LLNA-resultaterne er 85 % (N=142) med en følsomhed på 93 % (94/101) og en specificitet på 66 % (27/41) (baseret på en ny analyse foretaget af EURL ECVAM (12), hvor alle de eksisterende data er blevet taget i betragtning, og der ikke er blevet taget hensyn til de negative resultater for kemikalier med en log Kow på mere end 3,5 som beskrevet i punkt 4). Det er mere sandsynligt, at falsk negative forudsigelser i forbindelse med h-CLAT vil vedrøre kemikalier med lav til moderat hudsensibiliserende styrke (dvs. UN GHS-/CLP - underkategori 1B) end kemikalier med en høj hudsensibiliserende styrke (dvs. UN GHS-/CLP-underkategori 1A) (4) (13) (15). Samlet set viser denne information nytteværdien af h-CLAT som bidrag til identifikation af hudsensibiliseringsfarer. De nøjagtige værdier, der

her angives for h-CLAT som en selvstændig test, er imidlertid kun vejledende, da forsøgsmetoden bør betragtes i kombination med andre informationskilder i forbindelse med en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 7 og 8 i den generelle indledning. I forbindelse med vurderingen af metoder til test af hudsensibilisering uden brug af dyr bør man desuden holde sig for øje, at LLNA-forsøg samt andre dyreforsøg måske ikke fuldt ud afspejler situationen hos mennesker.

4. På grundlag af de data, der er tilgængelige i øjeblikket, har h-CLAT vist sig at være relevant for testkemikalier, der omfatter en række forskellige organiske funktionelle grupper, reaktionsmekanismer, hudsensibiliseringsstyrker (som fastlagt ved in vivo-undersøgelser) og fysisk-kemiske egenskaber (3) (14) (15). h-CLAT-metoden kan anvendes til at teste kemikalier, der er opløselige, eller som danner en stabil dispergering (dvs. en kolloid opløsning eller en suspension, i hvilken testkemikallet ikke bundfældes eller separeres fra opløsningsmidlet/bærestoffet i forskellige faser) i et passende opløsningsmiddel/bærestof (jf. punkt 14). Testkemikalier med en log Kow på over 3,5 har tendens til at give falsk negative resultater (14). Der bør derfor ikke tages hensyn til negative resultater i forbindelse med testkemikalier med en log Kow på over 3,5. De positive resultater, der opnås med testkemikalier med en log Kow på over 3,5, kan imidlertid fortsat anvendes til støtte for påvisningen af testkemikallet som et hudsensibiliserende stof. På grund af den anvendte cellelinjes begrænsede metaboliske kapacitet (16) og på grund af testbetingelserne kan pro-haptener (dvs. stoffer, der kræver enzymatisk aktivering f.eks. via P450-enzymen) og præ-haptener (dvs. stoffer, der aktiveres ved oxidering), især med en langsom oxideringsrate, også give negative resultater i h-CLAT (15). Fluorescerende testkemikalier kan vurderes ved hjælp af h-CLAT (17), men stærkt fluorescerende stoffer, der udsender den samme bølgelængde som fluoresceinisothiocyanat (FITC) eller propidiumiodid (PI), vil interferere med den flowcytometriske detektion og kan derfor ikke evalueres korrekt ved hjælp af FITC-konjugerede antistoffer eller PI. I sådanne tilfælde kan henholdsvis andre flouorochrom-mærkede antistoffer eller andre cytotoxicitetsmarkører anvendes, når blot det kan påvises, at de giver resultater svarende til FITC-mærkede antistoffer (jf. punkt 24) eller PI (jf. punkt 18) f.eks. via testning af kompetencestofferne i tillæg 1-2. I lyset af ovenstående bør negative resultater fortolkes i lyset af de anførte begrænsninger og sammen med andre informationskilder inden for rammerne af IATA. I de tilfælde, hvor der foreligger beviser for, at h-CLAT-metoden ikke kan anvendes på andre specifikke kategorier af testkemikalier, bør denne metode ikke anvendes til disse specifikke kategorier.
5. Som beskrevet ovenfor understøtter h-CLAT differentieringen mellem hudsensibiliserende og ikke-sensibiliserende stoffer. Den kan imidlertid også potentielt bidrage til vurderingen af sensibiliseringsstyrken (4) (5) (9), når den bruges i integrerede tilgange såsom IATA.

Der er dog behov for yderligere arbejde, fortrinsvis baseret på humane data, for at fastslå, hvordan h-CLAT-resultaterne eventuelt kan anvendes til styrkevurderingen.

6. Definitioner findes i tillæg 1.1.

PRINCIP FOR TESTEN

7. h-CLAT-metoden er et in vitro-assay, der måler ændringerne af ekspressionen af celleoverflademærker (dvs. CD86 og CD54) på en human monocytisk leukæmi-cellelinje, THP-1 celler, efter 24 timers eksponering for testkemikaliets. Disse overflademolekyler er typiske markører for monocytisk THP-1-aktivering og kan efterligne aktivering af dendritiske celler, der spiller en afgørende rolle i priming af T-celler. Ændringerne i ekspressionen af overflademærker måles ved hjælp af flowcytometri efter celfarvning med flouorochrom-mærkede antistoffer. Der foretages en samtidig cytotoxicitetsmåling med henblik på at måle, om der forekommer øget ekspression af overflademærker ved subcytotoxiske koncentrationer. Overflademærkerens relative fluorescerende intensitet sammenlignet med opløsningsmiddel-/bærestofkontrollen beregnes ved hjælp af forudsigelsesmodellen (jf. punkt 26) til støtte for differentieringen mellem hudsensibiliserende stoffer og ikke-sensibiliserende stoffer.

PÅVISNING AF KOMPETENCE

8. Før rutinemæssig brug af den test, der beskrives i dette tillæg til forsøgsmetoden B.71, bør laboratorierne godtgøre deres tekniske kompetence ved hjælp af de ti kompetencestoffer, der findes opført i tillæg 1.2. Desuden bør brugerne af testen opretholde en historisk database over data, der er genereret ved hjælp af reaktivitetskontrollerne (jf. punkt 11) og ved hjælp af de positive kontroller og opløsningsmiddel-/bærestofkontrollerne (jf. punkt 20-22), og de bør anvende disse data til at bekræfte, at reproducerbarheden af testen i deres laboratorium opretholdes over tid.

FREMANGSMÅDE

9. Denne forsøgsmetode er baseret på h-CLAT databasetjenesten om alternative metoder til dyreforsøg (DB-ALM), protokol nr. 158 (18), som repræsenterer den protokol, der blev anvendt i valideringsundersøgelsen koordineret af EURL ECVAM. Det anbefales, at denne protokol anvendes ved gennemførelsen og anvendelsen af h-CLAT-metoden i laboratoriet. Følgende er en beskrivelse af h-CLAT-metodens vigtigste komponenter og procedurer, der består af to trin: *dosisbestemmelsesassay* og *CD86/CD54-ekspressionsmåling*.

Præparering af celler

10. Human monocytisk leukæmi-cellelinjen, THP-1, bør anvendes til udførelse af h-CLAT-metoden. Det anbefales, at celler (TIB-202™) anskaffes fra en velrenommeret cellebank som f.eks. American Type Culture Collection.
11. THP-1 celler dyrkes i en fugtig atmosfære ved 37 °C og 5 % CO₂ og i RPMI-1640 medium suppleret med 10 % føtalt kalveserum (FBS), 0,05 mM 2-mercaptoethanol, 100 enheder/ml penicillin og 100 µg/ml streptomycin. Anvendelse af penicillin og streptomycin i dyrkningsmediet kan undgås. I sådanne tilfælde bør brugerne imidlertid kontrollere, at fraværet af antibiotika i dyrkningsmediet ikke indvirker på resultaterne, f.eks. ved at teste de kompetencestoffer, der findes opført i tillæg 1.2. For at minimere risikoen for kontaminering bør god celledyrkningspraksis under alle omstændigheder følges, uanset om der er antibiotika i celledyrkningsmediet eller ej. THP-1 celler podes rutinemæssigt hver 2. eller 3. dag ved en celletæthed på 0,1 til 0,2 × 10⁶ celler/ml. De bør opretholdes ved celletætheder fra 0,1 til 1,0 × 10⁶ celler/ml. Inden cellerne anvendes til testning, bør de valideres ved at gennemføre en reaktivitetskontrol. Reaktivitetskontrollen af cellerne bør udføres ved hjælp af de positive kontroller, 2,4-dinitrochlorbenzen (DNCB) (CAS nr. 97-00-7, ≥ 99 % renhed) og nikkelsulfat (NiSO₄) (CAS nr. 10101-97-0, ≥ 99 % renhed), og den negative kontrol, mælkesyre (LA) (CAS nr. 50-21-5, ≥ 85 % renhed), to uger efter optøning. Både DNCB og NiSO₄ bør give en positiv respons for såvel CD86- som CD54-celleoverflademærkører, og LA bør give en negativ respons for såvel CD86- som CD54-celleoverflademærkører. Kun celler, der bestod reaktivitetskontrollen, bør anvendes til assayet. Cellerne kan opformeres i op til to måneder efter optøning. Der bør højst være 30 opformeringer. Reaktivitetskontrollen bør foretages i henhold til de fremgangsmåder, der er beskrevet i punkt 20-24.
12. Til testning podes THP-1-cellerne ved en celletæthed på enten 0,1 × 10⁶ celler/ml eller 0,2 × 10⁶ celler/ml, og de forkultiveres i dyrkningsflasker i henholdsvis 72 timer eller 48 timer. Det er vigtigt, at celletætheden i dyrkningsflasken lige efter forkultiveringsperioden er så stabil som muligt i hvert enkelt eksperiment (ved at anvende en af de to ovennævnte forkultiveringsmetoder), fordi celletætheden i dyrkningsflasken lige efter forkultiveringen vil kunne påvirke ekspressionen af CD86/CD54, der induceres af allergener (19). På dagen for testningen genopslæmmes de celler, der høstes fra dyrkningsflasken, i et nyt dyrkningsmedium med en celletæthed på 2 × 10⁶ celler/ml. Derefter fordeles cellerne i en fladbundet 24-brønds plade med 500 µl (1 × 10⁶ celler/brønd) eller en fladbundet 96-brønds plade med 80 µl (1,6 × 10⁵ celler/brønd).

Dosisbestemmelsesassay

13. Der udføres et *dosisbestemmelseassay* for at fastlægge CV75, som er den koncentration af testkemikaliets, der resulterer i 75 % cellelevedygtighed (CV) sammenlignet med opløsningsmiddel-/bærestofkontrollen. CV75-værdien anvendes til at fastlægge

koncentrationen af testkemikalierne til CD86/CD54-ekspressionsmålingen (jf. punkt 20-24).

Fremstilling af testkemikalier og kontrolstoffer

14. Testkemikalierne og kontrolstofferne fremstilles på dagen for testen. I h-CLAT-metoden opløses testkemikalierne, eller de dispergeres stabilt (jf. også punkt 4) i fysiologisk saltopløsning eller medium som første opløsningsmiddel-/bærestofmulighed eller dimethylsulfoxid (DMSO, $\geq 99\%$ renhed) som anden opløsningsmiddel-/bærestofmulighed, hvis testkemikaliets ikke er opløseligt eller ikke danner en stabil dispersion i de to førstnævnte opløsningsmidler/bærestoffer, til slutkoncentrationer på 100 mg/ml (i fysiologisk saltopløsning eller medium) eller 500 mg/ml (i DMSO). Andre opløsningsmidler/bærestoffer end de ovenfor beskrevne kan anvendes, hvis der er videnskabeligt belæg herfor. Der bør tages hensyn til testkemikaliets stabilitet i det endelige opløsningsmiddel/bærestof.
15. Begyndende med 100 mg/ml (i fysiologisk saltopløsning eller medium) eller 500 mg/ml (i DMSO) stamopløsninger af testkemikalierne foretages følgende fortyndinger:
 - fysiologisk saltopløsning eller medium som opløsningsmiddel/bærestof: Der fremstilles otte stamopløsninger (otte koncentrationer) ved hjælp af tofoldsseriefortyndinger, idet det tilsvarende opløsningsmiddel/bærestof anvendes. Disse stamopløsninger fortyndes derefter igen 50-fold i dyrkningsmediet (arbejdsoopløsninger). Hvis den højeste slutkoncentration på pladen på 1 000 $\mu\text{g/ml}$ er ikke-toksisk, bør maksimumskoncentrationen fastsættes igen ved at udføre en ny cytotoxicitetstest. Slutkoncentrationen på pladen bør ikke være højere end 5 000 $\mu\text{g/ml}$ for testkemikalier, der er opløst eller stabilt dispergeret i en fysiologisk saltopløsning eller et medium.
 - DMSO som opløsningsmiddel/bærestof: Der fremstilles otte stamopløsninger (otte koncentrationer) ved hjælp af tofoldsseriefortyndinger, idet det tilsvarende opløsningsmiddel/bærestof anvendes. Disse stamopløsninger fortyndes yderligere 250-fold i dyrkningsmediet (arbejdsoopløsninger). Slutkoncentrationen på pladen bør ikke være højere end 1 000 $\mu\text{g/ml}$, selv om denne koncentration er ikke-toksisk.

Arbejdsoopløsningerne anvendes til slut til eksponering ved at tilsætte en mængde af arbejdsoopløsningen svarende til mængden af THP-1 cellesuspension i pladen (jf. også punkt 17) for at opnå en yderligere tofoldsfortynding (normalt er den endelige koncentrationsserie i pladen 7,81–1 000 $\mu\text{g/ml}$).

16. Den opløsningsmiddel-/bærestofkontrol, der anvendes i h-CLAT-metoden, er dyrkningsmedium (testkemikalier, der er opløst eller stabilt dispergeret (jf. punkt 4) enten i fysiologisk saltopløsning eller medium) eller DMSO (testkemikalier, der er opløst eller stabilt dispergeret i DMSO), der er testet ved en enkelt slutkoncentration i pladen på 0,2 %.

Der foretages den samme fortynding som den, der er beskrevet for arbejdsopløsninger i punkt 15.

Påføring af testkemikalier og kontrolstoffer

17. Det dyrkningsmedium eller de arbejdsopløsninger, der er beskrevet i punkt 15 og 16, blandes i forholdet 1:1 (v/v) med de cellesuspensioner, der er forberedt i den fladbundede 24-brønds eller 96-brønds plade (jf. punkt 12). De behandlede plader inkuberes derefter i $24 \pm 0,5$ timer ved 37°C og 5 % CO_2 . Der bør træffes forholdsregler for at undgå, at flygtige testkemikalier fordamper, og for at undgå krydskontaminering med testkemikalier mellem brøndene, f.eks. ved at forsegle pladerne inden inkubation med testkemikalierne (20).

Farvning med propidiumiodid (PI)

18. Efter $24 \pm 0,5$ timers eksponering overføres cellerne til prøveglas og indsamles ved centrifugering. Supernatanterne kasseres, og de tilbageværende celler genopslæmmes i 200 μl (96-brønds plade) eller 600 μl (24-brønds plade) fosfatbufret fysiologisk saltopløsning indeholdende 0,1 % bovint serumalbumin (farvebuffer). 200 μl af cellesuspensionen overføres til en rundbundet 96-brønds plade (ved 96 brønde) eller et mikrorør (ved 24 brønde) og vaskes to gange med 200 μl (ved 96 brønde) eller 600 μl (24 brønde) farvebuffer. Endelig genopslæmmes cellerne i farvebufferen (f.eks. 400 μl), og PI-opløsningen (f.eks. 20 μl) tilsættes (f.eks. er PI-opløsningens slutkoncentration 0,625 $\mu\text{g/ml}$). Andre cytotoxicitetsmarkører som f.eks. 7-aminoactinomycin D (7-AAD), trypanblåt eller andre kan anvendes, hvis det kan påvises, at denne alternative farvning giver resultater svarende til PI, f.eks. via testning af de kompetencestoffer, der findes opført i tillæg 1.2.

Cytotoksicitetsmåling ved hjælp af flowcytometri og vurdering af CV75-værdien

19. PI-optaget analyseres ved hjælp af flowcytometri med kanal FL-3. Der høstes i alt 10 000 levende celler (PI negativ). Cellelevedygtigheden kan beregnes af cytometeranalyseprogrammet ved hjælp af nedenstående ligning. Når cellelevedygtigheden er lav, bør der høstes op til 30 000 celler inklusive døde celler. Alternativt kan der høstes data i et minut efter, at analysen er startet.

$$\text{Cellelevedygtighed} = \frac{\text{Antal levende celler}}{\text{Antal høstede celler i alt}} \times 100$$

CV75 værdien (jf. punkt 13), dvs. en koncentration, der viser overlevelse af 75 % THP-1-celler (25 % cytotoxisk effekt), beregnes ved log-lineær interpolation ved hjælp af følgende ligning:

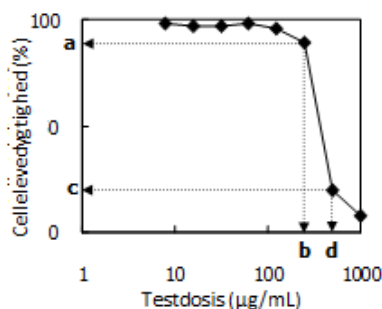
$$\text{Log CV75} = \frac{(75-c) \times \text{Log}(b) - (75-a) \times \text{Log}(d)}{a-c}$$

hvor:

a er minimumsværdien for cellelevedygtighed over 75 %

c er maksimumsværdien for cellelevedygtighed under 75 %

b og d er de koncentrationer, der giver henholdsvis a- og c-værdien for cellelevedygtighed.



Der kan anvendes andre fremgangsmåder til at udlede CV75-værdien, når blot det påvises, at dette ikke har nogen indvirkning på resultaterne (f.eks. via testning af kompetencestofferne).

CD86/CD54-ekspressionsmåling

Præparering af testkemikalier og kontrolstoffer

20. Det egnede opløsningsmiddel/bærestof (fysiologisk saltopløsning, medium eller DMSO, jf. punkt 14) anvendes til at opløse eller dispergere testkemikalierne stabilt. Testkemikalierne opløses først i den koncentration, der svarer til 100-foldfortynding (fysiologiske saltopløsninger eller medium) eller 500-foldfortynding (DMSO) af $1,2 \times \text{CV75}$ fastlagt i *dosisbestemmelsesassayet* (jf. punkt 19). Hvis CV75 ikke kan bestemmes (dvs. hvis en tilstrækkelig cytotoxisk effekt ikke observeres i *dosisbestemmelsesassayet*), bør den højeste opløselige eller stabilt dispergerede koncentration af testkemikallet fremstillet med hvert enkelt opløsningsmiddel/bærestof anvendes som startkoncentration. Bemærk, at slutkoncentrationen i pladen ikke bør overstige 5 000 µg/ml (ved fysiologisk saltopløsning eller medium) eller 1 000 µg/ml (ved DMSO). Dernæst laves der 1,2-foldsseriefortyndinger ved hjælp af det tilsvarende opløsningsmiddel/bærestof for at opnå stamopløsninger (otte koncentrationer fra $100 \times 1,2 \times \text{CV75}$ til $100 \times 0,335 \times \text{CV75}$ (fysiologisk saltopløsning eller medium) eller fra $500 \times 1,2 \times \text{CV75}$ til $500 \times 0,335 \times \text{CV75}$ (DMSO)), som testes ved hjælp af h-CLAT-metoden (se et eksempel på et doseringsskema i DB-ALM protokol nr. 158). Stamopløsningerne fortyndes yderligere 50-fold (fysiologisk saltopløsning eller medium) eller 250-fold (DMSO) i dyrkningsmediet (arbejdsopløsninger). Disse arbejdsopløsninger anvendes til slut til eksponering med en

yderligere to-foldsfortyndingsfaktor i pladen. Hvis resultaterne ikke opfylder de i punkt 29 og 30 opstillede acceptkriterier for cellelevedygtighed, kan *dosisbestemmelsesassayet* gentages for at fastlægge en mere præcis CV75-værdi. Bemærk, at der kun kan anvendes 24-brønds plader til CD86/CD54-ekspressionsmåling.

21. Opløsningsmiddel-/bærestofkontrollen fremstilles som beskrevet i punkt 16. Den positive kontrol, der anvendes i h-CLAT-metoden, er DNCB (jf. punkt 11), hvortil stamopløsningerne fremstilles i DMSO og fortyndes som beskrevet for stamopløsningerne i punkt 20. DNCB bør anvendes som den positive kontrol for *CD86/CD54-ekspressionsmåling* ved en enkelt slutkoncentration i pladen (typisk 4,0 µg/ml). For at opnå en 4,0 µg/ml koncentration af DNCB i pladen fremstilles en 2 mg/ml stamopløsning af DNCB i DMSO, som fortyndes yderligere 250-fold med dyrkningsmedium til en arbejdsopløsning på 8 µg/ml. Alternativt kan CV75-værdien af DNCB, der bestemmes i hver enkelt forsøgsfacilitet, anvendes som den positive kontrolkoncentration. Andre egnede positive kontroller kan anvendes, hvis der foreligger historiske data, som kan anvendes til at udlede sammenlignelige acceptkriterier for analyseserien. Bemærk, at slutkoncentrationen i pladen ikke bør overstige 5 000 µg/ml (fysiologisk saltopløsning eller medium) eller 1 000 µg/ml (DMSO). Acceptkriterierne for analyseserien er de samme som dem, der er beskrevet for testkemikaliet (jf. punkt 29), med undtagelse af det sidste acceptkriterium, da den positive kontrol testes ved en enkelt koncentration.

Påføring af testkemikalier og kontrolstoffer

22. Der er behov for en test for hvert enkelt testkemikalie og kontrolstof for at opnå en forudsigelse. Hvert eksperiment består af mindst to uafhængige analyseserier for *CD86/CD54-ekspressionsmåling* (jf. punkt 26-28). Hver enkelt uafhængig analyseserie foretages på forskellige dage eller på samme dag, forudsat at der for hver analyseserie: a) fremstilles uafhængige friske stamopløsninger og arbejdsopløsninger af testkemikaliet og antistofopløsningerne og b) anvendes uafhængigt høstede celler (dvs. cellerne indsamles fra forskellige dyrkningsflasker). Cellerne kan imidlertid komme fra den samme generation. De testkemikalier og kontrolstoffer, der er fremstillet som arbejdsopløsninger (500 µl), blandes med 500 µl opslæmmede celler (1×10^6 celler) i forholdet 1:1, og cellerne inkuberes i $24 \pm 0,5$ timer som beskrevet i punkt 20 og 21. Ved hver analyseserie er et enkelt replikat for hver koncentration af testkemikaliet og kontrolstoffet tilstrækkelig, fordi en forudsigelse opnås fra mindst to uafhængige analyseserier.

Cellefarvning og analyse

23. Efter $24 \pm 0,5$ timers eksponering overføres cellerne fra 24-brønds pladen til prøveglas, indsamles ved centrifugering og vaskes derefter to gange med 1 ml farvebuffer (om nødvendigt kan der foretages yderligere vaskninger). Efter vask blokeres cellerne med 600 µl blokerende opløsning (farvebuffer indeholdende 0,01 % (vægt/volumen) globulin (Cohn

fraktion II, III, human; SIGMA, #G2388-10G eller tilsvarende)) og inkuberes ved 4 °C i 15 min. Efter blokering fordeles cellerne i tre delprøver a 180 µl i en rundbundet 96-brønds plade eller et mikrorør.

24. Efter centrifugering farves cellerne med 50 µl FITC-mærkede anti-CD86-, anti-CD54- eller muse-IgG1 (isotype)-antistoffer ved 4 °C i 30 min. De antistoffer, der er beskrevet i h-CLAT DB-ALM protokol nr. 158 (18), bør anvendes ved at opløse 3:25 v/v (til CD86 (BD-PharMingen, #555657; Klon: Fun-1)) eller 3:50 volumen/volumen (til CD54 (DAKO, #F7143; Klon: 6.5B5) og IgG1 (DAKO, #X0927)) med farvebuffer. Disse antistofopløsningsfaktorer blev af testudviklerne fastlagt som dem, der giver det bedste signal/støjforhold. Det er testudviklernes erfaring, at antistoffernes fluorescensintensitet normalt er konsekvent mellem forskellige partier. Brugere kan imidlertid overveje at titrere antistofferne under deres egne laboratorieforhold for at finde frem til de koncentrationer, der er bedst egnede. Andre fluorochrom-mærkede anti-CD86- og/eller anti-CD54-antistoffer kan anvendes, hvis det kan påvises, at de giver resultater svarende til FITC-konjugerede antistoffer, f.eks. via testning af de kompetencestoffer, der findes opført i tillæg 1.2. Det skal bemærkes, at ændring af klonen eller leverandøren af antistofferne som beskrevet i h-CLAT DB-ALM protokol nr. 158 (18) kan påvirke resultaterne. Efter vaskning to gange eller mere med 150 µl af farvebufferen genopslættes cellerne i farvebufferen (f.eks. 400 µl), og PI-opløsningen (f.eks. 20 µl for at opnå en endelig koncentration på 0,625 µg/ml) eller en anden cytotoxicitetsmarkøropløsning (jf. punkt 18) tilsættes. Ekspressionsniveauerne for CD86 og CD54 og cellelevedygtighed analyseres ved hjælp af flowcytometri.

DATA OG RAPPORTERING

Dataevaluering

25. Ekspressionen af CD86 og CD54 analyseres ved hjælp af flowcytometri ved registreringskanal FL-1. På grundlag af det geometriske gennemsnit for fluorescensintensitet (MFI) beregnes den relative fluorescensintensitet (RFI) af CD86 og CD54 for positive kontrolceller (ctrl) og kemikaliebehandlede celler i henhold til nedenstående ligning:

$$RFI = \frac{MFI \text{ kemikaliebehandlet celle} - MFI \text{ kemikaliebehandlede isotypekontrolceller}}{MFI \text{ ctrlceller behandlet m opløsn/bærestof} - MFI \text{ isotypectrlceller behandlet m opløsn/bærestof}} \times 100$$

Cellelevedygtigheden fra isotypekontrolcellerne (der er farvet med muse-IgG1 (isotype)-antistoffer) beregnes ligeledes i henhold til den i punkt 19 beskrevne ligning.

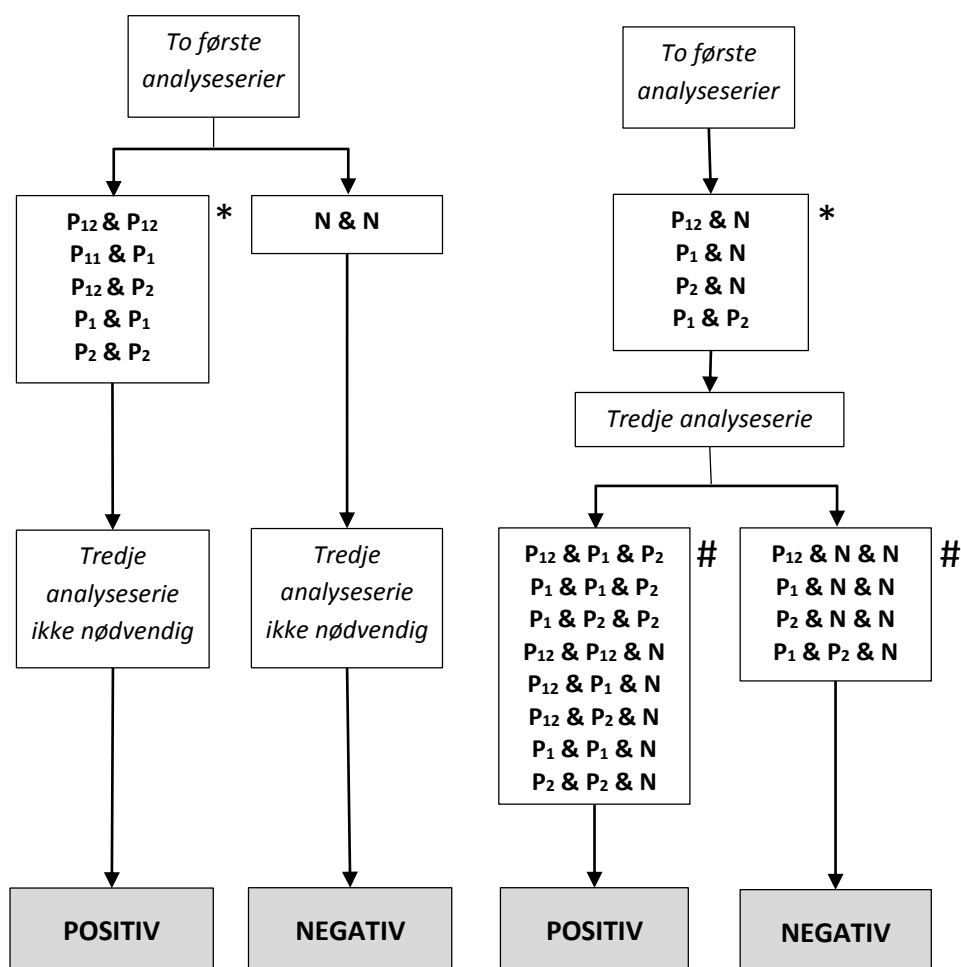
Forudsigelsesmodel

26. I forbindelse med *CD86/CD54*-ekspressionsmåling testes hvert testkemikalie i mindst to uafhængige analyseserier for at udlede en enkelt forudsigelse (POSITIV eller NEGATIV). En h-CLAT-forudsigelse anses for at være POSITIV, hvis mindst en af følgende betingelser er opfyldt i to ud af to eller mindst to ud af tre uafhængige analyseserier, ellers anses h-CLAT-forudsigelsen for at være NEGATIV (figur 1):

- RFI for CD86 svarer til eller er højere end 150 % ved enhver testet koncentration (med en cellelevedygtighed ≥ 50 %).
- RFI for CD54 svarer til eller er højere end 200 % ved enhver testet koncentration (med en cellelevedygtighed ≥ 50 %).

27. Det fremgår af det ovenstående, at såfremt de første to analyseserier begge er positive for CD86 og/eller begge er positive for CD54, anses h-CLAT-forudsigelsen for at være POSITIV, og det er ikke nødvendigt at gennemføre en tredje analyseserie. Tilsvarende, hvis de to første analyseserier er negative for begge markører, anses h-CLAT-forudsigelsen for at være NEGATIV (med behørig hensyntagen til bestemmelserne i punkt 30), uden at det er nødvendigt at gennemføre en tredje analyseserie. Hvis de to første analyseserier imidlertid ikke er overensstemmende for mindst en af markørerne (CD54 eller CD86), er der behov for en tredje analyseserie, og den endelige forudsigelse vil blive baseret på flertallet af de tre individuelle analyseserier (dvs. to ud af tre). Det skal i denne forbindelse bemærkes, at hvis der foretages to uafhængige analyseserier, og den ene kun er positiv for CD86 (herefter benævnt P_1), mens den anden kun er positiv for CD54 (herefter benævnt P_2), bør der gennemføres en tredje analyseserie. Hvis denne tredje analyseserie er negativ for begge markører (herefter benævnt N), anses h-CLAT-forudsigelsen for at være NEGATIV. Hvis en tredje analyseserie på den anden side er positiv for en af markørerne (P_1 eller P_2) eller for begge markørerne (herefter benævnt P_{12}), anses h-CLAT-forudsigelsen for at være POSITIV.

Figur 1: Den forudsigelsesmodel, der anvendes i h-CLAT-metoden. En h-Clat-forudsigelse bør overvejes inden for rammerne af en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 7 og 8 i den generelle indledning.



P1: analyseserie med kun CD86 positiv; P2: analyseserie med kun CD54 positiv; P12: analyseserie med både CD86 og CD54 positiv; N: analyseserie med hverken CD86 eller CD54 positiv.

*Boksene viser de relevante kombinationer af resultater af de første to analyseserier, uafhængigt af den rækkefølge, i hvilken de er opnået.

#Boksene viser de relevante kombinationer af resultater fra de tre analyseserier på grundlag af de resultater, der er opnået i de to første analyseserier vist i boksen ovenfor, men afspejler ikke den rækkefølge, i hvilken de er opnået.

28. For de testkemikalier, der forudsiges at være POSITIVE med h-CLAT, kan der, hvis det ønskes, fastsættes to værdier for effektiv koncentration (EC), EC150 for CD86 og EC200 for CD54, dvs. den koncentration, ved hvilken testkemikalierne gav en RFI på 150 eller 200. Disse EC-værdier kan også bidrage til vurderingen af sensibiliseringsstyrken (9), når de bruges i integrerede tilgange såsom IATA (4) (5) (6) (7) (8). De kan beregnes ved hjælp af følgende ligninger:

$$EC150 \text{ (for CD86)} = B_{conc} + [(150 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC200 \text{ (for CD54)} = B_{conc} + [(200 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

hvor

A_{conc} er den laveste koncentration udtrykt i $\mu\text{g/ml}$ med $\text{RFI} > 150$ (CD86) eller 200 (CD54)

B_{conc} er den højeste koncentration udtrykt i $\mu\text{g/ml}$ med $\text{RFI} < 150$ (CD86) eller 200 (CD54)

A_{RFI} er RFI ved den laveste koncentration med $\text{RFI} > 150$ (CD86) eller 200 (CD54)

B_{RFI} er RFI ved den højeste koncentration med $\text{RFI} < 150$ (CD86) eller 200 (CD54).

Med henblik på mere præcist at udlede EC150- og EC200-værdierne, kan det være nødvendigt med tre uafhængige analyseserier for *CD86/CD54-ekspressionsmåling*. De endelige EC150- og EC200-værdier fastsættes derefter som en gennemsnitsværdi af EC-værdierne beregnet på grundlag af tre uafhængige analyseserier. Når kun to ud af tre uafhængige analyseserier opfylder kriterierne for positivitet (jf. punkt 26-27), vælges den højeste EC150- eller EC200-værdi af de to beregnede værdier.

Acceptkriterier

29. Følgende acceptkriterier bør være opfyldt, når h-CLAT-metoden anvendes (22) (27):

- Cellelevedygtigheden i mediekontrollen og opløsningsmiddel-/bærestofkontrollen bør være højere end 90 %.
- I opløsningsmiddel-/bærestofkontrollen bør RFI-værdierne for både CD86 og CD54 ikke overstige de positive kriterier (CD86 $\text{RFI} \geq 150$ % og CD54 $\text{RFI} \geq 200$ %). RFI-værdierne i opløsningsmiddel-/bærestofkontrollen beregnes ved hjælp af den formel, der er beskrevet i punkt 25 ("MFI for kemikaliet" erstattes med "MFI for opløsningsmiddel/bærestof", og "MFI for opløsningsmiddel/bærestof" erstattes af "MFI for (medium) kontrol").
- I både mediekontrollen og opløsningsmiddel-/bærestofkontrollen bør MFI-forholdet mellem både CD86 og CD54 og isotypekontrollen være > 105 %.
- I den positive kontrol (DNCB), bør RFI-værdierne for både CD86 og CD54 opfylde de positive kriterier (CD86 $\text{RFI} \geq 150$ og CD54 $\text{RFI} \geq 200$), og cellelevedygtigheden bør være højere end 50 %.
- For testkemikaliet bør cellelevedygtigheden være højere end 50 % ved mindst fire testede koncentrationer i hver analyseserie.

30. Negative resultater accepteres kun for testkemikalier, der fremviser en cellelevedygtighed på under 90 % ved den højeste testede koncentration (dvs. $1,2 \times \text{CV75}$ i henhold til den fortyndingsserie, der er beskrevet i punkt 20). Hvis cellelevedygtigheden ved $1,2 \times \text{CV75}$ svarer til eller er højere end 90 %, bør det negative resultat kasseres. I sådanne tilfælde

anbefales det, at det forsøges at finjustere dosisbestemmelsen ved at gentage bestemmelsen af CV75. Det bemærkes, at når 5 000 µg/ml i fysiologisk saltopløsning (eller medium eller andre opløsningsmidler/bærestoffer), 1 000 µg/ml i DMSO eller den højeste opløselige koncentration anvendes som den maksimale testkoncentration af et testkemikalie, er et negativt resultat acceptabelt, selv om cellelevedygtigheden ligger på over 90 %.

Testrapport

31. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie

Stof med kun én bestanddel

- kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer
- fysisk udseende, log Kow, vandopløselighed, DMSO-opløselighed, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt
- renhed, urenheders kemiske identitet i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.
- eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)
- testede koncentrationer
- opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt
- begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof for de enkelte testkemikalier.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger

- så vidt muligt kendetegnet ved f.eks. kemisk identitet (jf. ovenfor), renhed, kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber (jf. ovenfor) i det omfang, det er muligt
- fysisk udseende, vandopløselighed, DMSO-opløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt
- molekylvægt eller tilsyneladende molekylvægt i tilfælde af blandinger/polymerer med kendt sammensætning eller andre oplysninger, der er relevante for undersøgelsens gennemførelse
- eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)
- testede koncentrationer
- opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt

- begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof for de enkelte testkemikalier.

Kontrol

Positiv kontrol

- kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer
- fysisk udseende, log K_{ow} , vandopløselighed, DMSO-opløselighed, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt og relevant
- renhed, urenheders kemiske identitet i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.
- eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)
- testede koncentrationer
- opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt
- reference til historiske positive kontrolresultater, der udviser passende acceptkriterier for analyseserien, hvis det er relevant.

Negativ kontrol og opløsningsmiddel-/bærestofkontrol

- kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer
- renhed, urenheders kemiske identitet i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.
- fysisk udseende, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber ved brug af andre opløsningsmidler/bærestoffer end dem, der er nævnt i testvejledningen, i det omfang, det er muligt
- opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt
- begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof for de enkelte testkemikalier.

Testbetingelser

- navn og adresse på sponsoren, testfaciliteten og undersøgelseslederen
- beskrivelse af den anvendte test
- anvendt cellelinje, opbevaringsforhold og kilde (f.eks. det anlæg, hvorfra den er anskaffet)
- den anvendte flowcytometri (f.eks. model), herunder instrumentindstillinger, globulin, antistoffer og anvendt cytotoxicitetsmarkør

- den procedure, der er blevet anvendt til at påvise laboratoriets kompetence til at anvende forsøgsmetoden via testning af kompetencestoffer, og den metode, der er blevet anvendt til at påvise reproducerbare resultater over tid, f.eks. historiske kontroldata og/eller historiske reaktivitetskontroldata.

Acceptkriterier for testen

- cellelevedygtigheds-, MFI- og RFI-værdier opnået ved opløsningsmiddel-/bærestofkontrol sammenlignet med acceptintervallerne
- cellelevedygtigheds- og RFI-værdier opnået ved den positive kontrol sammenlignet med acceptintervallerne
- cellelevedygtigheden ved alle de testede koncentrationer af det testede kemikalie.

Forsøgsmetode

- antal anvendte analyseserier
- koncentrationer af testkemikaliet, anvendt påførsels- og eksponeringstid (hvis en anden end den anbefalede)
- varigheden af eksponeringen (hvis en anden end den anbefalede)
- beskrivelse af de anvendte evaluerings- og beslutningskriterier
- beskrivelse af eventuelle ændringer i forsøgsmetoden.

Resultater

- tabulering af data, herunder CV75 (hvis muligt), individuelle geometriske MFI-, RFI-, cellelevedygtighedsværdier, EC150/EC200-værdier (hvis muligt), opnået for testkemikaliet og for den positive kontrol i hver enkelt analyseserie, og en angivelse af klassificeringen af testkemikaliet i forhold til forudsigelsesmodellen
- beskrivelse af eventuelle andre relevante observationer, hvis det er relevant.

Diskussion af resultater

- diskussion af de resultater, der er opnået med h-CLAT-metoden
- vurdering af testresultaterne inden for rammerne af en IATA, hvis der foreligger andre relevante oplysninger.

Konklusioner

LITTERATUR

- (1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767-773.
- (2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* 21, 428-437.
- (3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Tilgængelig på: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>.
- (4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318-1332.
- (5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333-1347.
- (6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489-504.
- (7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371-379.
- (8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71, 337-351.

- (9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol.* 89, 2355-2383.
- (10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol.* DOI 10.1002/jat.3281.
- (11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150-60.
- (12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Tilgængelig på: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>.
- (13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report. Tilgængelig på: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>.
- (14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, 599-609.
- (15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation test: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch Toxicol* 87, 1683-1699.
- (17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for

evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.

- (18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), s. 23 ff. Tilgængelig på: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>.
- (19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.
- (20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.
- (21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2005, 96 ff.
- (22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Tilgængelig på: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En).
- (23) United Nations (UN) (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 Tilgængelig på: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).
- (25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

Tillæg 1.1

DEFINITIONER

Nøjagtighed: Overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for testens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for "konkordans", forstået som den andel af korrekte udfald, som en forsøgsmetode fører til (21).

AOP (Adverse Outcome Pathway): Sekvens af begivenheder fra den kemiske struktur af et målkemikalie eller en gruppe af ensartede kemikalier gennem den molekylære udløsende begivenhed til et in vivo-resultat af betydning (22).

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

CV75: Den anslåede koncentration, der giver en cellelevedygtighed på 75 %.

EC150: De koncentrationer, der viser RFI-værdier på 150 i CD86-ekspressionen.

EC200: De koncentrationer, der viser RFI-værdier på 200 i CD54-ekspressionen.

Flowcytometri: En cytometrisk teknik, i hvilken celler opslået i en væske flyder en ad gangen gennem et fokus bestående af magnetiserende lys, som spredes i mønstre, der er karakteristiske for cellerne og deres bestanddele. Cellerne mærkes hyppigt med fluorescerende markører, så lyset først absorberes og derefter udsendes ved ændrede frekvenser.

Fare: Den iboende egenskab ved et stof eller en situation, som kan have en skadelig virkning, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende stof.

IATA (integreret tilgang til testning og vurdering): En struktureret tilgang, der bruges til identifikation af farer (potentiale), farebeskrivelse (styrke) og/eller sikkerhedsvurdering (potentiale/styrke og eksponering) af et kemikalie eller en gruppe af kemikalier, som på strategisk vis integrerer og vægter alle relevante data som grundlag for lovgivningsmæssige beslutninger om mulige farer og/eller risici og/eller behovet for yderligere målrettede og derfor færrest mulige test.

Mediekontrol: Et ubehandlet replikat, som indeholder alle komponenter fra et forsøgssystem. Prøven behandles sammen med prøver behandlet med testkemikaliet og andre kontroller for at afgøre, hvorvidt opløsningsmidlet/bærestoffet interagerer med forsøgssystemet.

Blanding: Blanding eller opløsning, der består af to eller flere stoffer.

Stof med kun én bestanddel: Et stof, der defineres ved dets mængdemæssige sammensætning, hvori en hovedbestanddel udgør mindst 80 % (w/w).

Stof med flere bestanddele: Et stof, der defineres ved dets mængdemæssige sammensætning, hvori mere end en hovedbestanddel er til stede i en koncentration på $\geq 10\%$ (w/w) og $< 80\%$ (w/w). Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en fremstillingsproces. Forskellen mellem en blanding og et stof med forskellige bestanddele er, at blandingen er fremstillet ved blanding af to eller flere stoffer uden kemisk reaktion. Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en kemisk reaktion.

Positiv kontrol: Et replikat, som indeholder alle komponenterne fra et forsøgssystem og er behandlet med et stof, som vides at inducere en positiv respons. For at sikre at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør den positive respons ikke være overdrevent stor.

Præ-haptener: Kemikalier, der bliver allergifremkaldende via abiotisk omdannelse.

Pro-haptener: Kemikalier, der kræver en enzymaktivering for at udløse det hudsensibiliserende potentiale.

Relativ fluorescensintensitet (RFI): Relative værdier af det geometriske gennemsnit af fluorescensintensitet (MFI) i kemisk behandlede celler sammenlignet med MFI i celler behandlet med opløsningsmiddel/bærestof.

Relevans: Beskrivelse af sammenhængen mellem testen og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang testen måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Testens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af relevansen (21).

Pålidelighed: Mål for, i hvilken grad en test kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over tid, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og repeterbarhed inden for laboratorier (21).

Analyseserie: En analyseserie består af et eller flere testkemikalier, der testes samtidig med en opløsningsmiddel-/bærestofkontrol og med en positiv kontrol.

Følsomhed: Andel af alle positive/aktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Følsomheden er et mål for nøjagtigheden af en test, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en tests relevans (21).

Farvebuffer: En phosphatbufret fysiologisk saltopløsning indeholdende 0,1 % bovint serumalbumin.

Opløsningsmiddel-/bærestofkontrol: En ubehandlet prøve, som indeholder alle

komponenterne fra et testsystem, herunder det anvendte opløsningsmiddel/bærestof. Den anvendes til at fastlægge basislinjeresponsen for de prøver, som er behandlet med testkemikaliet opløst eller stabilt dispergeret i det samme opløsningsmiddel/bærestof. Når denne prøve testes med en samtidig mediekontrol, viser den også, hvorvidt opløsningsmidlet eller bærestoffet interagerer med testsystemet.

Specificitet: Andel af alle negative/inaktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Det er et mål for nøjagtigheden af et forsøg, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en tests relevans (21).

Stof: Et grundstof og forbindelser heraf, i naturlig tilstand eller industrielt fremstillet, herunder sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, der kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning.

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne metode.

De Forenede Nationers globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – UN GHS): System til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, faresætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljøet (23).

UVCB: Stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

Gyldig test: En test, der anses for at være tilstrækkeligt relevant og pålideligt til et bestemt formål, og som er baseret på videnskabeligt forsvarlige principper. En test er aldrig gyldig i absolut forstand, men kun i relation til et bestemt formål (21).

Tillæg 1.2

KOMPETENCESTOFFER

Før den rutinemæssige brug af den test, der er beskrevet i dette tillæg til forsøgsmetode B.71, bør laboratorierne godtgøre deres tekniske kompetence ved at opnå den forventede h-CLAT-forudsigelse på korrekt vis for de ti kompetencestoffer, der anbefales i tabel 1, og ved at opnå de CV75-, EC150- og EC200-værdier, der falder ind under de respektive referenceintervaller for otte ud af de ti kompetencestoffer. Disse kompetencestoffer er udvalgt således, at de repræsenterer responsområdet for hudsensibiliseringsfare. Andre udvælgelseskriterier var, at kemikalierne er kommercielt tilgængelige, at der foreligger in vivo-referencedata af høj kvalitet, og at der er genereret in vitro-data af høj kvalitet med h-CLAT-forsøgsmetoden. Der foreligger ligeledes offentliggjorte referencedata for h-CLAT-metoden (3) (14).

Tabel 1: Anbefalede stoffer til godtgørelse af teknisk kompetence i tilknytning til h-CLAT-metoden

Kompetencestoffer	CAS RN	Fysisk form	In vivo-forudsigelse ¹	CV75-reference-område i µg/ml ²	h-CLAT-resultater for CD86 (EC150-reference-interval i µg/ml) ²	h-CLAT-resultater for CD54 (EC200-reference-interval i µg/ml) ²
2,4-Dinitrochlorbenzen	97-00-7	Fast stof	Sensibiliserende stof (ekstrem)	2-12	Positiv (0,5-10)	Positiv (0,5-15)
4-Phenylenediamin	106-50-3	Fast stof	Sensibiliserende stof (stærk)	5-95	Positiv (<40)	Negativ (>1,5) ³
Nikkelsulfat	10101-97-0	Fast stof	Sensibiliserende stof (moderat)	30-500	Positiv (<100)	Positiv (10-100)
2-Mercaptobenzothiazol	149-30-4	Fast stof	Sensibiliserende stof (moderat)	30-400	Negativ (>10) ³	Positiv (10-140)
R(+)-Limonen	5989-27-5	Væske	Sensibiliserende stof (svag)	>20	Negativ (>5) ³	Positiv (<250)
Imidazolidinyl-urinstof	39236-46-9	Fast stof	Sensibiliserende stof (svag)	25-100	Positiv (20-90)	Positiv (20-75)
Isopropanol	67-63-0	Væske	Ikke-sensibiliserende	>5 000	Negativ >5 000	Negativ >5 000
Glycerol	56-81-5	Væske	Ikke-sensibiliserende	>5 000	Negativ >5 000	Negativ >5 000
Mælkesyre	50-21-5	Væske	Ikke-sensibiliserende	1 500-5 000	Negativ >5 000	Negativ >5 000
4-Aminobenzoesyre	150-13-0	Fast stof	Ikke-sensibiliserende	> 1 000	Negativ (>1 000)	Negativ (>1 000)

Forkortelser: CAS RN = Registernummer i Chemical Abstracts Service

¹ Prognoser for in vivo-fare og (styrke) er baseret på LLNA-data (3) (14). In vivo-styrken er beregnet ud fra de kriterier, der foreslås af ECETOC (24).

² På baggrund af historiske observerede værdier (13) (25).

³ Historisk set er der opnået en overvægt af negative resultater for denne markør, derfor forventes for det meste et negativt

resultat. Det angivne interval blev fastlagt på grundlag af de få historiske positive resultater, der er observeret. Opnås der et positivt resultat, bør EC-værdien ligge inden for det angivne referenceinterval.

Tillæg 2

IN VITRO-HUDSENSIBILISERING: U937 CELL LINE ACTIVATION TEST (U-SENS™)

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

1. U-SENS™ måler ændringer i ekspressionen af celleoverflademarkører i tilknytning til processen med aktivering af monocytter og dendritiske celler (DC) (dvs. CD86) i den humane histiocytære lymfomcellelinje U937 efter eksponering for allergifremkaldende stoffer (1). De målte ekspressionsniveauer for celleoverflademarkøren CD86 i cellelinjen U937 anvendes dernæst til støtte for differentieringen mellem hudsensibiliserende stoffer og ikke-sensibiliserende stoffer.
2. U-SENS™ er blevet evalueret i en valideringsundersøgelse (2) koordineret af l'Oreal, og efterfølgende foretog det videnskabelige rådgivende udvalg (ESAC) under EU-referencelaboratoriet for alternativer til dyreforsøg (EURL ECVAM) uafhængige peer reviews (3). På grundlag af alle de tilgængelige beviser og input fra myndigheder og interessenter anbefalede EURL ECVAM (4), at U-SENS™ anvendes som en del af en IATA til støtte for differentieringen mellem hudsensibiliserende stoffer og ikke-sensibiliserende stoffer med henblik på fareklassificering og mærkning. OECD drøfter i øjeblikket i sit vejledende dokument om rapportering af strukturerede tilgange til dataintegration og individuelle informationskilder, der anvendes inden for IATA for hudsensibilisering, en række casestudier, der beskriver forskellige forsøgsstrategier og forudsigelsesmodeller. En af de forskelligt definerede tilgange er baseret på U-SENS™-assayet (5). Der kan også findes eksempler på anvendelsen af U-SENS™-data i kombination med anden information, herunder historiske data og eksisterende gyldige humane data (6), andre steder i litteraturen (4) (5) (7).
3. Det viste sig, at U-SENS™-metoden kunne overføres til laboratorier med erfaring inden for celledyrkningsteknikker og flowcytometrianalyse. Graden af reproducerbarhed i de forudsigelser, der kan forventes fra testen, ligger i størrelsesordenen henholdsvis 90 % og 84 % inden for og mellem laboratorier (8). De resultater, der genereres i valideringsundersøgelsen (8), og andre offentliggjorte undersøgelser (1), viser generelt, at nøjagtigheden med hensyn til sondring mellem hudsensibiliserende stoffer (dvs. UN GHS-/CLP-kategori 1) og ikke-sensibiliserende stoffer er på 86 % (N=166) med en følsomhed på 91 % (118/129) og en specificitet på 65 % (24/37) sammenlignet med LLNA-resultaterne. Sammenlignet med resultater fra mennesker er nøjagtigheden med hensyn til sondring mellem hudsensibiliserende stoffer (dvs. UN GHS-/CLP-kategori 1) og ikke-sensibiliserende stoffer på 77 % (N=101) med en følsomhed på 100 % (58/58) og en specificitet på 47 % (20/43). Sammenlignet med LLNA er det mere sandsynligt, at falsk

negative forudsigelser i forbindelse med U-SENS™ vil vedrøre kemikalier med lav til moderat hudsensibiliserende styrke (dvs. UN GHS-/CLP-underkategori 1B) end kemikalier med en høj hudsensibiliserende styrke (dvs. UN GHS-/CLP-underkategori 1A) (1) (8) (9). Samlet set viser disse oplysninger nytteværdien af U-SENS™-metoden som bidrag til identifikation af hudsensibiliseringsfarer. De nøjagtige værdier, der her angives for U-SENS™ som en selvstændig test, er imidlertid kun vejledende, da testen bør betragtes i kombination med andre informationskilder i forbindelse med en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 7 og 8 i den generelle indledning. I forbindelse med vurderingen af metoder til test af hudsensibilisering uden brug af dyr bør man desuden holde sig for øje, at LLNA-forsøg samt andre dyreforsøg måske ikke fuldt ud afspejler situationen hos mennesker.

4. På grundlag af de data, der foreligger i øjeblikket, viste U-SENS™-testen sig at kunne anvendes på testkemikalier (herunder ingredienser i kosmetik, f.eks. konserveringsmidler, overfladeaktive stoffer, aktive stoffer, farvestoffer) omfattende en lang række organiske funktionelle grupperes fysisk-kemiske egenskaber, hudsensibiliseringsstyrke (som bestemt i in vivo-undersøgelser) og det spektrum af reaktionsmekanismer, som man ved, er knyttet til hudsensibilisering (dvs. Michael acceptor, Schiff basedannelse, acyloverførselsmiddel, bimolekylær nucleofil substitutionsreaktion [SN2], eller nukleofil aromatisk substitution [SNAr]) (1) (8) (9) (10). U-SENS™-metoden kan anvendes til at teste kemikalier, der er opløselige, eller som danner en stabil dispersion (dvs. en kolloid opløsning eller en suspension, i hvilken testkemikaliyet ikke bundfældes eller separeres fra opløsningsmidlet/bærestoffet i forskellige faser) i et passende opløsningsmiddel/bærestof (jf. punkt 13). Kemikalier, der i datasættet blev angivet som præ-haptener (dvs. stoffer, der aktiveres ved oxidering) eller pro-haptener (dvs. stoffer, der kræver en enzymaktivering, f.eks. via P450 enzymer), blev korrekt forudsagt af U-SENS™ (1) (10). Membranforstyrrende stoffer kan føre til falsk positive resultater som følge af en ikke-specifik stigning i CD86-ekspressionen, eftersom tre ud af syv falske positive i tilknytning til in vivo-referenceklassificeringen var overfladeaktive stoffer (1). Positive resultater med overfladeaktive stoffer som sådan bør betragtes med forsigtighed, mens negative resultater af overfladeaktive stoffer fortsat kan anvendes til støtte for identifikationen af testkemikaliyet som et ikke-sensibiliserende stof. Fluorescerende testkemikalier kan vurderes med U-SENS™ (1), men stærkt fluorescerende testkemikalier, der udsender den samme bølglængde som fluoresceinisothiocyanat (FITC) eller propidiumiodid (PI), vil interferere med den flowcytometriske påvisning og kan derfor ikke evalueres korrekt ved hjælp af FITC-konjugerede antistoffer (potentielt falske negative) eller PI (levedygtighed er ikke målbar). I sådanne tilfælde kan henholdsvis andre flouorochrom-mærkede antistoffer eller andre cytotoxicitetsmarkører anvendes, når blot det kan påvises, at de giver resultater svarende til FITC-mærkede antistoffer eller PI (jf. punkt 18) f.eks. via testning af de kompetencestoffer, der findes opført i tillæg 2-2. I lyset af det ovenstående bør positive

resultater med overfladeaktive stoffer og negative resultater med stærke fluorescerende testkemikalier fortolkes på baggrund af de fastsatte begrænsninger og sammen med andre informationskilder inden for rammerne af IATA. I de tilfælde, hvor der foreligger beviser for, at U-SENS™-metoden ikke kan anvendes på andre specifikke kategorier af testkemikalier, bør denne metode ikke anvendes til disse specifikke kategorier.

5. Som beskrevet ovenfor understøtter U-SENS™ differentieringen mellem hudsensibiliserende og ikke-sensibiliserende stoffer. Den kan imidlertid også bidrage til vurderingen af sensibiliseringsstyrken, når den anvendes i integrerede tilgange såsom IATA. Der er dog behov for yderligere arbejde, fortrinsvis baseret på humane data, for at fastslå, hvordan U-SENS™-resultaterne eventuelt kan anvendes til styrkevurderingen.
6. Definitioner findes i tillæg 2.1.

PRINCIP FOR TESTEN

7. U-SENS™-metoden er et in vitro-assay, der måler ændringerne i ekspresionen af CD86-celleoverflademærket på en human histiocytær lymfomcellelinje, U937, efter 45 ± 3 timers eksponering for testkemikaliets. CD86-overflademærket er en typisk markør for U937-aktivering. CD86 er kendt som et medstimulerende molekyle, der kan efterligne monocytisk aktivering, som spiller en afgørende rolle i primingen af T-celler. Ændringerne i ekspresionen af CD86-overflademærket måles ved hjælp af flowcytometri efter cellefarvning med fluoresceinisothiocyanat (FITC)-mærkede antistoffer. Cytotoksicitetsmålingen foretages (f.eks. ved hjælp af PI) samtidig med henblik på at vurdere, om forøgelsen af ekspresionen af CD86-celleoverflademærket optræder ved subcytotoksiske koncentrationer. Stimuleringsindekset (SI) for CD86-celleoverflademærket sammenlignet med opløsningsmiddel-/bærestofkontrollen beregnes ved hjælp af forudsigelsesmodellen (jf. punkt 19) til støtte for differentieringen mellem hudsensibiliserende stoffer og ikke-sensibiliserende stoffer.

PÅVISNING AF KOMPETENCE

8. Forud for den rutinemæssige brug af den test, der beskrives i dette tillæg til forsøgsmetoden B.71, bør laboratorierne godtgøre deres tekniske kompetence ved hjælp af de ti kompetencestoffer, der findes opført i tillæg 2.2. i overensstemmelse med Good *in vitro* Method Practices (11). Desuden bør brugerne af testen opretholde en historisk database over data, der er genereret ved hjælp af reaktivitetskontrollerne (jf. punkt 11) og ved hjælp af de positive kontroller og opløsningsmiddel-/bærestofkontrollerne (jf. punkt 15-16), og de bør anvende disse data til at bekræfte, at reproducerbarheden af testen i deres laboratorium opretholdes over tid.

FREMGANGSMÅDE

9. Dette forsøg er baseret på U-SENS™ DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation (DB-ALM) protokol nr. 183 (12). Der bør anvendes standardprocedurer (SOP) ved gennemførelsen og anvendelsen af U-SENS™-metoden i laboratoriet. Et automatiseret system til gennemførelse af U-SENS™ kan anvendes, hvis det kan påvises, at det giver tilsvarende resultater, f.eks. via testning af de kompetencestoffer, der findes opført i tillæg 2.2. Følgende er en beskrivelse af de vigtigste komponenter og procedurer i forbindelse med U-SENS™-testen.

Præparering af celler

10. Den humane histiocytære lymfomcellelinje, U937 (13), bør anvendes til udførelse af U-SENS™-testen. Celler (klon CRL1593.2) bør anskaffes fra en velrenommeret cellebank som f.eks. American Type Culture Collection.
11. U937-celler dyrkes i en fugtig atmosfære ved 37 °C og 5 % CO₂ og i RPMI-1640-medium suppleret med 10 % føtalt kalveserum (FBS), 2 mM L-glutamin, 100 enheder/ml penicillin og 100 µg/ml streptomycin (komplet medium). U937-celler opformerer rutinemæssigt hver 2. eller 3. dag ved en celletæthed på henholdsvis 1,5 eller 3 × 10⁵ celler/ml. Celletætheden bør ikke overstige 2 × 10⁶ celler/ml, og cellelevedygtigheden målt ved trypanblå-udelukkelse bør være ≥ 90 % (bør ikke anvendes ved den første opformering efter optøning). Inden cellerne anvendes til testning, bør hver enkelt celleportion, FCS eller antistoffer valideres ved at gennemføre en reaktivitetskontrol. Reaktivitetskontrollen af cellerne bør foretages ved hjælp af den positive kontrol, picrylsulfonsyre (2,4,6-Trinitrobenzensulfonsyre: TNBS) (CASRN 2508-19-2, ≥ 99 % renhed), og den negative kontrol, mælkesyre (LA) (CASRN 50-21-5, ≥ 85 % renhed), mindst en uge efter optøning. Ved reaktivitetskontrollen bør seks slutkoncentrationer testes for hver af de to kontroller (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 µg/ml og LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml). TNBS opløst i komplet medium bør give en positiv og koncentrationsbestemt respons for CD86 (f.eks. når en positiv koncentration, CD86 SI ≥ 150, efterfølges af en koncentration med en øget CD86 SI), og LA opløst i komplet medium bør give en negativ respons for CD86 (jf. punkt 21). Kun den celleportion, der har bestået reaktivitetskontrollen to gange, bør anvendes til assayet. Celler kan opformeres op til syv uger efter optøning. Der bør højst foretages 21 opformeringer. Reaktivitetskontrollen bør foretages i henhold til de fremgangsmåder, der er beskrevet i punkt 18-22.
12. Til testning podes U937-cellerne ved en celletæthed på enten 3 × 10⁵ celler/ml eller 6 × 10⁵ celler/ml, og de forkultiveres i dyrkningsflasker i henholdsvis to dage eller én dag. Der kan anvendes andre forkultiveringsforhold end de ovenfor nævnte, hvis der fremlægges tilstrækkeligt videnskabeligt belæg herfor, f.eks. via en testning af de kompetencestoffer,

der findes opført i tillæg 2.2. På dagen for testningen genopslømmes de celler, der høstes fra dyrkningsflasken, i nyt dyrkningsmedium med en celletæthed på 5×10^5 celler/ml. Derefter fordeles cellerne i en fladbundet 96-brønds plade med 100 µl (endelig celletæthed på $0,5 \times 10^5$ celler/brønd).

Fremstilling af testkemikalier og kontrolstoffer

13. Der foretages en vurdering af opløseligheden forud for testningen. Med henblik herpå opløses testkemikalierne, eller de dispergeres stabilt ved en koncentration på 50 mg/ml i et komplet medium som det første valg af opløsningsmiddel eller i dimethylsulfoxid (DMSO, ≥ 99 % renhed) som det andet valg af opløsningsmiddel/bærestof, hvis testkemikali- et ikke er opløseligt i det komplette mediumopløsningsmiddel/-bærestof. Når testkemikali- et skal anvendes i testen, opløses det til en slutkoncentration på 0,4 mg/ml i komplet medium, hvis kemikali- et er opløseligt i dette opløsningsmiddel/bærestof. Hvis kemikali- et kun er opløseligt i DMSO, opløses det til en koncentration på 50 mg/ml. Andre opløsningsmidler/bærestoffer end de ovenfor beskrevne kan anvendes, hvis der er videnskabeligt belæg herfor. Der bør tages hensyn til testkemikaliet's stabilitet i det endelige opløsningsmiddel/bærestof.
14. Testkemikalierne og kontrolstofferne fremstilles på dagen for testen. Da der ikke foretages et dosisbestemmelsesassay, bør seks slutkoncentrationer testes ved første analyseserie (1, 10, 20, 50, 100 og 200 µg/ml) i det tilsvarende opløsningsmiddel/bærestof enten i komplet medium eller i 0,4 % DMSO i mediet. Ved de efterfølgende analyseserier begyndende med 0,4 mg/ml i komplet medium eller 50 mg/ml i DMSO fremstilles opløsninger af testkemikali- et (dvs. mindst fire koncentrationer) ved hjælp af det tilsvarende opløsningsmiddel/bærestof. Arbejdsopløsningerne anvendes til slut til behandling ved at tilsætte lige store mængder af U937-cellesuspensionen (jf. punkt 11 ovenfor) til mængden af arbejdsopløsningen på pladen for at opnå en yderligere tofoldsopløsning (12). Koncentrationerne (mindst fire koncentrationer) til eventuelle yderligere analyseserier vælges på grundlag af de individuelle resultater af alle de tidligere analyseserier (8). De slutkoncentrationer, der kan anvendes, er 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 og 200 µg/ml. Den maksimale slutkoncentration er 200 µg/ml. Hvis der observeres en positiv CD86-værdi ved 1 µg/ml, evalueres en koncentration på 0,1 µg/ml for at finde frem til den koncentration af testkemikali- et, der ikke inducerer CD86 over den positive tærskel. EC150 (den koncentration, ved hvilken et kemikali- et når den positive CD86-tærskel på 150 %, jf. punkt 19) beregnes for hver analyseserie, hvis en positiv CD86-koncentration/respons observeres. Hvor testkemikali- et inducerer en positiv CD86-respons, der ikke er koncentrationafhængig, er EC150 måske ikke relevant som beskrevet i U-SENS™ DB-ALM protokol nr. 183 (12). For hver analyseserie beregnes CV70 (den koncentration, ved

hvilket kemikaliet når cytotoxicitetsgrænsen på 70 %, se punkt 19), når det er muligt (12). Med henblik på at undersøge koncentration/responsvirkningen af stigningen i CD86 bør en hvilken som helst koncentration fra de koncentrationer, der kan anvendes, vælges jævnt fordelt mellem EC150 (eller den højeste CD86-negative ikke-cytotoksiske koncentration) og CV70 (eller den højeste tilladte koncentration, dvs. 200 µg/ml). Der bør testes minimum fire koncentrationer i hver analyseserie, idet mindst to af koncentrationerne skal være de samme som i den/de tidligere analyseserie/analyserier med henblik på sammenligning.

15. Den opløsningsmiddel-/bærestofkontrol, der anvendes i U-SENSTM-testen, er komplet medium (for testkemikalier, der er opløst eller stabilt dispergeret) (jf. punkt 4) eller 0,4 % DMSO i komplet medium (for testkemikalier, der er opløst eller stabilt dispergeret i DMSO).
16. Den positive kontrol, der anvendes i U-SENSTM-testen, er TNBS (jf. punkt 11), der fremstilles i komplet medium. TNBS bør anvendes som den positive kontrol ved CD86-ekspressionsmåling ved en enkelt slutkoncentration i pladen (50 µg/ml), der giver en cellelevedygtighed på > 70 %. For at opnå en 50 µg/ml koncentration af TNBS i pladen fremstilles 1 M (dvs. 293 mg/ml) stamopløsning af TNBS i komplet medium, som fortyndes yderligere 2930-fold med komplet medium til en arbejdsopløsning på 100 µg/ml. Mælkesyre (LA, CAS 50-21-5) bør anvendes som den negative kontrol ved 200 µg/ml opløst i komplet medium (fra en stamopløsning på 0,4 mg/ml). I hver enkelt plade for hver enkelt analyseserie fremstilles tre replikater af komplet medium ubehandlet kontrol, opløsningsmiddel-/bærestofkontrol, negative og positive kontroller (12). Andre egnede positive kontroller kan anvendes, hvis der foreligger historiske data, som kan anvendes til at udlede sammenlignelige acceptkriterier for analyseserien. Acceptkriterierne for analyseserien er de samme som dem, der er beskrevet for testkemikaliet (jf. punkt 12).

Påføring af testkemikalier og kontrolstoffer

17. Den opløsningsmiddel-/bærestofkontrol og de arbejdsopløsninger, der er beskrevet i punkt 14-16, blandes i forholdet 1:1 (v/v) med de cellesuspensioner, der er forberedt i den fladbundede 96-brønds plade (jf. punkt 12). De behandlede plader inkuberes derefter i 45±3 timer ved 37 °C og 5 % CO₂. Forud for inkubationen forsegles pladerne med en semipermeabel membran for at undgå fordampning af flygtige testkemikalier og krydskontaminering mellem celler, der er behandlet med testkemikalier (12).

Cellefarvning

18. Efter 45±3 timers eksponering overføres cellerne til en V-formet mikrotiterplade og indsamles ved centrifugering. Opløselighedsinterferens defineres som krystaller eller dråber, der observeres under mikroskop 45 ± 3 timer efter behandling (før cellefarvning).

Supernatanterne kasseres, og de tilbageværende celler vaskes en gang med 100 µl af en iskold phosphatbufret fysiologisk saltopløsning (PBS) indeholdende 5 % føtalt kalveserum (farvebuffer). Efter centrifugering genopslømmes cellerne med 100 µl af farvebufferen og farves med 5 µl (dvs. 0,25 µg) FITC-mærket anti-CD86- eller muse-IgG1 (isotype)-antistoffer ved 4 °C i 30 min. i mørke. De antistoffer, der er beskrevet i U-SENS™ DB-ALM protokol nr. 183 (12), bør anvendes (for CD86: BD-PharMingen #555657 Klon: Fun-1, eller Caltag/Invitrogen # MHCD8601 Klon: BU63; og for IgG1: BD-PharMingen #555748 eller Caltag/Invitrogen # GM4992). Det er testudviklernes erfaring, at antistoffernes fluorescensintensitet normalt er konsekvent mellem forskellige partier. Andre kloner eller leverandører af antistoffer, der har bestået reaktivitetskontrollen, kan anvendes til assayet (jf. punkt 11). Brugere kan dog overveje at titrere antistofferne under deres egne laboratorieforhold for at finde frem til de koncentrationer, der er bedst egnede. Andre påvisningssystemer som f.eks. fluorchrom-mærkede anti-CD86-antistoffer kan anvendes, hvis det kan påvises, at de giver resultater svarende til FITC-konjugerede antistoffer, f.eks. via testning af de kompetencestoffer, der findes opført i tillæg 2.2. Efter vask med 100 µl farvebuffer to gange og en gang med 100 µl iskold PBS genopslømmes cellerne i iskold PBS (f.eks. 125 µl for prøver, der analyseres manuelt rør for rør, eller 50 µl, når der anvendes en auto-sampler plade), og PI-opløsning tilsættes (slutkoncentration på 3 µg/ml). Andre cytotoxicitetsmarkører som f.eks. 7-Aminoactinomycin D (7-AAD), eller trypanblåt kan anvendes, hvis det kan påvises, at denne alternative farvning giver resultater svarende til PI, f.eks. via testning af de kompetencestoffer, der findes opført i tillæg 2.2.

Flowcytometrianalyse:

19. Ekspressionsniveauerne for CD86 og cellelevedygtigheden analyseres ved hjælp af flowcytometri. Cellerne vises i et punktdiagram over størrelse (FSC) og granularitet (SSC) i logaritmisk skala for klart at identificere populationen i en første gate R1 og eliminere affald. Der høstes i alt 10 000 celler i gate R1 for hver enkelt brønd. Celler fra den samme gate R1 vises i et FL3- eller FL4/SSC-punktdiagram. De levedygtige celler beskrives ved at anbringe en anden gate R2, der frasorterer populationen af propidiumiodid-negative celler (kanal FL3 eller FL4). Cellelevedygtigheden kan beregnes af cytometeranalyseprogrammet ved hjælp af nedenstående ligning. Når cellelevedygtigheden er lav, kan der høstes op til 20 000 celler inklusive døde celler. Alternativt kan der høstes data i et minut efter, at analysen er startet.

$$\text{Cellelevedygtighed} = \frac{\text{Antal levende celler}}{\text{Antal høstede celler i alt}} \times 100$$

Procentdelen af FL1-positive celler måles dernæst blandt disse levedygtige celler, der er gated på R2 (inden for R1). Celleoverfladeekspressionen af CD86 analyseres i et FL1/SSC

punktdiagram gated på levedygtige celler (R2).

For komplet medium-/IgG1-brønde sættes analysemarkøren tæt på hovedpopulationen, så de komplette mediekontroller har IgG1, der ligger inden for målområdet på 0,6 til 0,9 %.

Farveinterferens defineres som en ændring af det FITC-mærkede IgG1-punktdiagram (IgG1 FL1 Geo Mean SI ≥ 150 %).

Stimuleringsindekset (SI) for CD86 i kontrolcellerne (ubehandlede eller i 0,4 % DMSO) og de kemisk behandlede celler beregnes i henhold til nedenstående ligning:

$$S.I. = \frac{\% \text{ af } CD86^+ \text{ behandlede celler} - \% \text{ af } IgG1^+ \text{ behandlede celler}}{\% \text{ af } CD86^+ \text{ kontrolceller} - \% \text{ af } IgG1^+ \text{ kontrolceller}} \times 100$$

% af ubehandlede IgG1⁺ kontrolceller: benævnt procentdelen af FL1-positive IgG1-celler defineret med analysemarkøren (accepteret interval på $\geq 0,6$ % og $< 1,5$ %, jf. punkt 22) blandt de ubehandlede levedygtige celler.

% af IgG1⁺/CD86⁺-kontrolceller/behandlede celler: benævnt procentdelen af FL1-positive IgG1/CD86-celler målt uden at flytte analysemarkøren blandt de levedygtige kontrolceller/behandlede celler.

DATA OG RAPPORTERING

Dataevaluering

20. Følgende parametre beregnes i U-SENSTM -testen: CV70-værdien, dvs. en koncentration, der giver en U937-celleoverlevelse på 70 % (30 % cytotoxisk effekt), og EC150-værdien, dvs. den koncentration, ved hvilken testkemikalierne inducerede et CD86-stimuleringsindeks (SI) på 150 %.

CV70 beregnes ved log-lineær interpolation ved hjælp af følgende ligning:

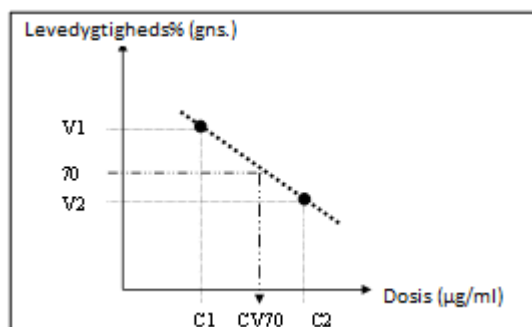
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

hvor:

V1 er minimumsværdien for cellelevedygtighed over 70 %

V2 er maksimumsværdien for cellelevedygtighed under 70 %

C1 og C2 er de koncentrationer, der viser henholdsvis V1 og V2-værdien for cellelevedygtighed.



Der kan anvendes andre fremgangsmåder til at udlede CV70-værdien, når blot det påvises, at dette ikke har nogen indvirkning på resultaterne (f.eks. via testning af kompetencestofferne).

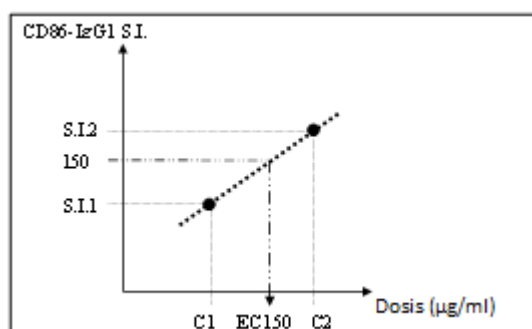
EC150 beregnes ved log-lineær interpolation ved hjælp af følgende ligning:

$$EC150 = C1 + [(150 - SI1) / (SI2 - SI1) * (C2 - C1)]$$

hvor:

C1 er den højeste koncentration udtrykt i µg/ml med et CD86 SI < 150 % (SI 1)

C2 er den laveste koncentration udtrykt i µg/ml med et CD86 SI < 150 % (SI 2).



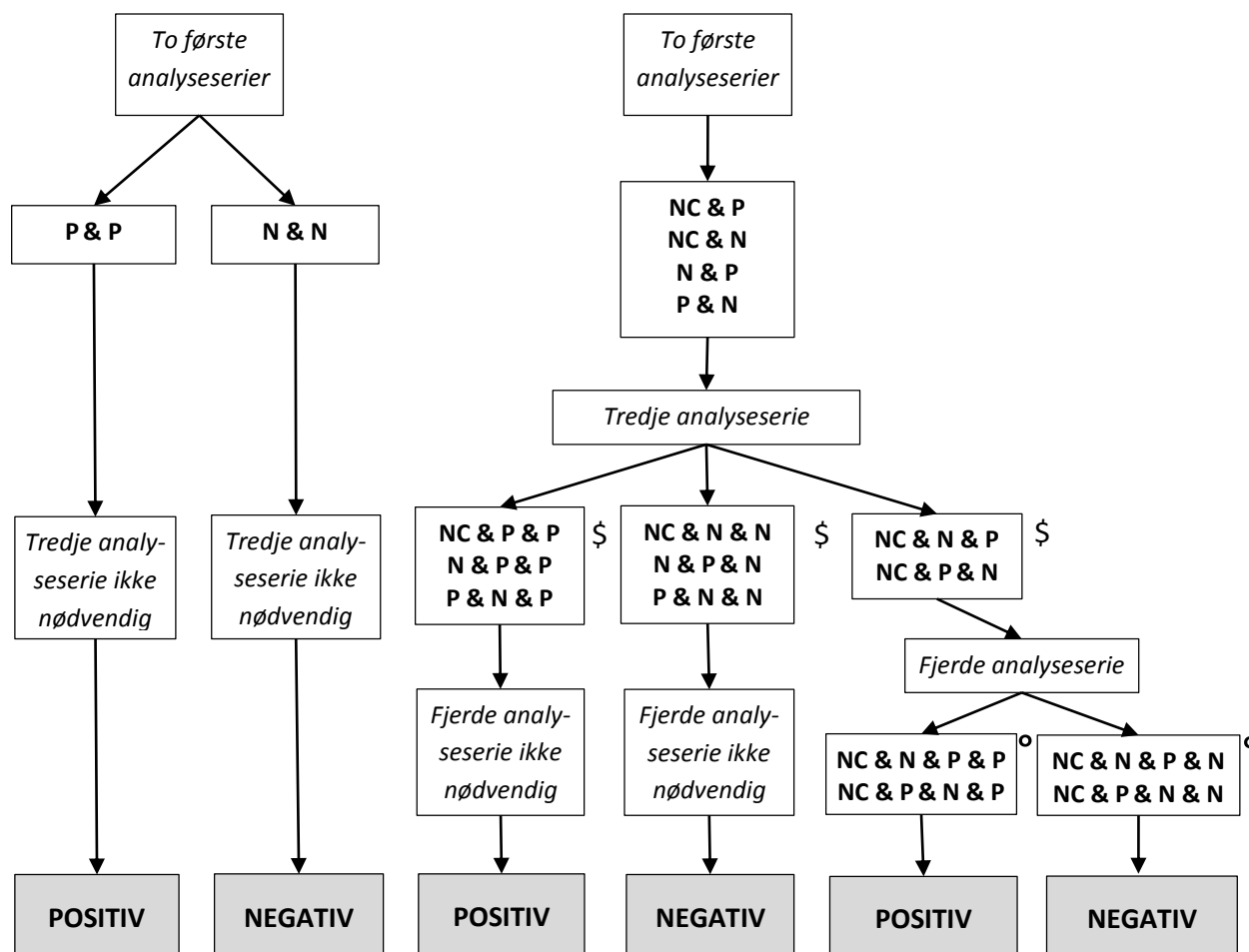
EC150- og CV70-værdierne beregnes

- For hver analyseserie: De individuelle EC150- og CV70-værdier anvendes som redskaber til at undersøge koncentration/responsvirkningen af stigningen i CD86 (jf. punkt 14).
- Den overordnede CV70 bestemmes på grundlag af den gennemsnitlige levedygtighed (12).
- De overordnede EC150-værdier bestemmes for det testkemikalie, der forudsiges at være POSITIVT med U-SENS™, på grundlag af de gennemsnitlige SI for CD86-værdierne (jf. punkt 21) (12).

Forudsigelsesmodel

21. I forbindelse med CD86-ekspressionsmåling testes hvert testkemikalie i mindst fire koncentrationer og i mindst to uafhængige analyseserier (der foretages på forskellige dage) for at udlede en enkelt forudsigelse (POSITIV eller NEGATIV).
- Den individuelle konklusion på en U-SENSTM-analyseserie betragtes som NEGATIV (herefter N), hvis SI for CD86 er på under 150 % ved alle ikke-cytotoksiske koncentrationer (cellelevedygtighed $\geq 70\%$), og hvis der ikke observeres nogen interferens (cytotoksisk effekt, opløselighed: jf. punkt 18 eller farve: jf. punkt 19, uanset ved hvilke ikke-cytotoksiske koncentrationer interferens påvises). I alle andre tilfælde: SI for CD86 er højere end eller lig med 150 %, og/eller interferens observeres, den individuelle konklusion på en U-SENSTM-analyseserie betragtes som POSITIV (herefter P).
 - En U-SENSTM-forudsigelse betragtes som NEGATIV, hvis mindst to uafhængige analyseserier er negative (N) (figur 1). Hvis de to første analyseserier begge er negative (N), betragtes U-SENSTM-forudsigelsen som NEGATIV, og en tredje analyseserie er unødvendig.
 - En U-SENSTM-forudsigelse betragtes som POSITIV, hvis mindst to uafhængige analyseserier er positive (P) (figur 1). Hvis de to første analyseserier begge er positive (P), betragtes U-SENSTM-forudsigelsen som POSITIV, og en tredje analyseserie er unødvendig.
 - Da der ikke foretages et dosisbestemmelsesassay, er der en undtagelse, hvis SI for CD86 i første analyseserie er højere end eller lig med 150 % udelukkende ved den højeste ikke-cytotoksiske koncentration. Analyseserien betragtes i dette tilfælde som ikke entydig (NC), og yderligere koncentrationer (mellem den højeste ikke-cytotoksiske koncentration og den laveste cytotoksiske koncentration – jf. punkt 20) bør testes i supplerende analyseserier. Hvis en analyseserie påvises som NC, bør der foretages mindst to ekstra analyseserier, og en fjerde analyseserie, hvis forsøg 2 og 3 ikke er overensstemmende (N og/eller P) (figur 1). Opfølgende analyseserier vil blive betragtet som positive, selv hvis en af de ikke-cytotoksiske koncentrationer giver en CD86-værdi på eller over 150 %, eftersom koncentrationen er blevet tilpasset det specifikke testkemikalie. Den endelige forudsigelse baseres på flertalsresultatet af de tre eller fire individuelle analyseserier (dvs. to ud af tre eller to ud af fire) (figur 1).

Figur 1: Den forudsigelsesmodel, der anvendes i U-SENSTM-testen. En U-SENSTM-forudsigelse bør overvejes inden for rammerne af en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 4 og punkt 7, 8 og 9 i den generelle indledning.



N: Analyseserie med ingen CD86 positiv eller interferens observeret.

P: Analyseserie med CD86 positiv og/eller interferens observeret.

NC: Ikke entydig. Første analyseserie med Ikke entydig, hvor CD86 udelukkende er positiv ved den højeste ikke-cytotoksiske koncentration.

#: En Ikke entydig (NC) individuel konklusion, der kun tilskrives den første analyseserie, medfører automatisk et behov for en tredje analyseserie for at opnå et flertal af positive (P) eller negative (N) konklusioner i mindst to ud af tre uafhængige analyseserier.

\$: Boksene viser de relevante kombinationer af resultater fra de tre analyseserier på grundlag af de resultater, der er opnået i de to første analyseserier vist i boksen ovenfor.

°: Boksene viser de relevante kombinationer af resultater fra de fire analyseserier på grundlag af de resultater, der er opnået i de tre første analyseserier vist i boksen ovenfor.

Acceptkriterier

22. Følgende acceptkriterier bør være opfyldt, når U-SENS™-testen anvendes (12):

- Efter eksponeringsperioden på 45 ± 3 timer skulle den gennemsnitlige levedygtighed af de tre prøver af ubehandlede U937-celler være $> 90 \%$, og ingen afvigelse i CD86-ekspressionen observeres. Den grundlæggende CD86-ekspression af ubehandlede U937-celler skulle ligge i intervallet $\geq 2 \%$ og $\leq 25 \%$.
- Når DMSO anvendes som opløsningsmiddel, vurderes gyldigheden af DMSO-bærestofkontrollen ved at beregne et DMSO SI sammenlignet med ubehandlede celler, og den gennemsnitlige levedygtighed af celler i de tre prøver skulle være $> 90 \%$. DMSO-bærestofkontrollen er gyldig, hvis middelværdien af dens tre CD86 SI var lavere end 250% af middelværdien for de tre CD86 SI af ubehandlede U937-celler.
- Analyseserierne betragtes som gyldige, hvis mindst to ud af tre IgG1-værdier for ubehandlede U937-celler lå inden for intervallet $\geq 0,6 \%$ og $< 1,5 \%$.
- Den samtidigt gennemførte negative kontrol (mælkesyre) betragtes som gyldig, hvis mindst to ud af tre replikater var negative (CD86 SI $< 150 \%$) og ikke-cytotoksiske (cellelevedygtighed $\geq 70 \%$).
- Den positive kontrol (TNBS) betragtes som gyldig, hvis mindst to ud af tre replikater var positive (CD86 SI $\geq 150 \%$) og ikke-cytotoksiske (cellelevedygtighed $\geq 70 \%$).

Testrapport

23. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie

Stof med kun én bestanddel

- kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer
- fysisk udseende, opløselighed i komplet medium, DMSO-opløselighed, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt
- renhed, urenheders kemiske identitet i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.
- eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)
- testede koncentrationer
- opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt
- begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof for de enkelte testkemikalier.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

- så vidt muligt kendetegnet ved f.eks. kemisk identitet (jf. ovenfor), renhed, kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber (jf. ovenfor) i det omfang, det er muligt
- fysisk udseende, opløselighed i komplet medium, DMSO-opløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt
- molekylvægt eller tilsyneladende molekylvægt i tilfælde af blandinger/polymerer med kendt sammensætning eller andre oplysninger, der er relevante for undersøgelsens gennemførelse
- eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)
- testede koncentrationer
- opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt
- begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof for de enkelte testkemikalier.

Kontrol

Positiv kontrol

- kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer
- fysisk udseende, DMSO-opløselighed, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt og relevant
- renhed, urenheders kemiske identitet i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.
- eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)
- testede koncentrationer
- opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt
- reference til historiske positive kontrolresultater, der udviser passende acceptkriterier for analyseserien, hvis det er relevant.

Negativ kontrol og opløsningsmiddel-/bærestofkontrol

- kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer
- renhed, urenheders kemiske identitet i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.
- fysisk udseende, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber ved brug af andre opløsningsmidler/bærestoffer end dem, der er nævnt i testvejledningen, i det omfang, det er muligt

- opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt
- begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof for de enkelte testkemikalier.

Testbetingelser

- navn og adresse på sponsoren, testfaciliteten og undersøgelseslederen
- beskrivelse af den anvendte test
- anvendt cellelinje, opbevaringsforhold og kilde (f.eks. det anlæg, hvorfra den er anskaffet)
- den anvendte flowcytometri (f.eks. model), herunder de anvendte instrumentindstillinger, antistoffer og den anvendte cytotoxicitetsmarkør
- den procedure, der er blevet anvendt til at påvise laboratoriets kompetence til at anvende forsøgsmetoden via testning af kompetencestoffer, og den metode, der er blevet anvendt til at påvise reproducerbare resultater over tid, f.eks. historiske kontroldata og/eller historiske reaktivitetskontroldata.

Acceptkriterier for testen

- cellelevedygtighed og CD86 SI-værdier opnået ved opløsningsmiddel-/bærestofkontrol sammenlignet med acceptintervallerne
- cellelevedygtighed og SI-værdier opnået ved den positive kontrol sammenlignet med acceptintervallerne
- cellelevedygtighed ved alle de testede koncentrationer af det testede kemikalie.

Forsøgsmetode

- antal anvendte analyseserier
- koncentrationer af testkemikaliets, anvendt påførsels- og eksponeringstid (hvis en anden end den anbefalede)
- eksponeringens varighed
- beskrivelse af de anvendte evaluerings- og beslutningskriterier
- beskrivelse af eventuelle ændringer i forsøgsmetoden.

Resultater

- tabulering af data, herunder CV70 (hvis muligt), SI, cellelevedygtighedsværdier, EC150-værdier (hvis muligt), opnået for testkemikaliets og for den positive kontrol i hver enkelt analyseserie, og en angivelse af klassificeringen af testkemikaliets i forhold til forudsigelsesmodellen
- beskrivelse af eventuelle andre relevante observationer, hvis det er relevant.

Diskussion af resultaterne

- diskussion af de resultater, der er opnået med U-SENSTM-testen
- vurdering af testresultaterne inden for rammerne af en IATA, hvis der foreligger andre relevante oplysninger.

Konklusioner

LITTERATUR

- (1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.
- (2) EC EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Tilgængelig på: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations.
- (3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28178 EN doi 10.2787/815737. Tilgængelig på: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].
- (4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28553 EN; doi 10.2760/588955. Tilgængelig på: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/euro-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>.
- (5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
- (6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Tilgængelig på: [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].
- (7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.
- (8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015).

Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.

- (9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehn, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.
- (10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1696.
- (11) OECD. (2018). Udkast til vejledende dokument: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Tilgængelig på: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.
- (12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENSTM), s. 33 ff. Tilgængelig på: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].
- (13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.
- (14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Tilgængelig på: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (15) United Nations (UN) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Tilgængelig på: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Tilgængelig på:

<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.

- (17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Tilgængelig på: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Tillæg 2.1

DEFINITIONER

Nøjagtighed: Overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for testens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for "konkordans", forstået som den andel af korrekte udfald, som en forsøgsmetode fører til (14).

AOP (Adverse Outcome Pathway): Sekvens af begivenheder fra den kemiske struktur af et målkemikalie eller en gruppe af ensartede kemikalier gennem den molekylære udløsende begivenhed til et in vivo-resultat af betydning (15).

CD86-koncentration/respons: Der forekommer koncentrationsafhængighed (eller koncentration/respons), når en positiv koncentration ($\text{CD86 SI} \geq 150$) efterfølges af en koncentration med en stigende CD86 SI.

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

CV70: Den anslåede koncentration, der viser en cellelevedygtighed på 70 %.

Afvigelse: En afvigelse defineres ved i) den korrigerede %CD86⁺-værdi af det ubehandlede kontrolreplikat 3 er mindre end 50 % af den gennemsnitlige korrigerede %CD86⁺-værdi for de ubehandlede kontrolreplikater 1 og 2, og ii) den korrigerede %CD86⁺-værdi af det negative kontrolreplikat 3 er mindre end 50 % af den gennemsnitlige korrigerede %CD86⁺-værdi for de negative kontrolreplikater 1 og 2.

EC150: De anslåede koncentrationer, der giver 150 % SI for CD86-ekspression.

Flowcytometri: En cytometrisk teknik, i hvilken celler opslået i en væske flyder en ad gangen gennem et fokus bestående af magnetiserende lys, som spredes i mønstre, der er karakteristiske for cellerne og deres bestanddele. Cellerne mærkes hyppigt med fluorescerende markører, så lyset først absorberes og derefter udsendes ved ændrede frekvenser.

Fare: Den iboende egenskab ved et stof eller en situation, som kan have en skadelig virkning, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende stof.

IATA (integreret tilgang til testning og vurdering): En struktureret tilgang, der bruges til identifikation af farer (potentiale), farebeskrivelse (styrke) og/eller sikkerhedsvurdering (potentiale/styrke og eksponering) af et kemikalie eller en gruppe af kemikalier, som på strategisk vis integrerer og vægter alle relevante data som grundlag for lovgivningsmæssige beslutninger om mulige farer og/eller risici og/eller behovet for yderligere målrettede og derfor færrest mulige test.

Blanding: Blanding eller opløsning, der består af to eller flere stoffer.

Stof med kun én bestanddel: Et stof, der defineres ved dets mængdemæssige sammensætning, hvori en hovedbestanddel udgør mindst 80 % (w/w).

Stof med flere bestanddele: Et stof, der defineres ved dets mængdemæssige sammensætning, hvori mere end en hovedbestanddel er til stede i en koncentration på $\geq 10\%$ (w/w) og $< 80\%$ (w/w). Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en fremstillingsproces. Forskellen mellem en blanding og et stof med forskellige bestanddele er, at blandingen er fremstillet ved blanding af to eller flere stoffer uden kemisk reaktion. Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en kemisk reaktion.

Positiv kontrol: Et replikat, som indeholder alle komponenterne fra et forsøgssystem og er behandlet med et stof, som vides at inducere en positiv respons. For at sikre at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør den positive respons ikke være overdrevent stor.

Præ-haptener: Kemikalier, der bliver allergifremkaldende via abiotisk omdannelse, f.eks. via oxidation.

Pro-haptener: Kemikalier, der kræver en enzymaktivering for at udløse det hudsensibiliserende potentiale.

Relevans: Beskrivelse af sammenhængen mellem testen og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang testen måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Testens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af relevansen (14).

Pålidelighed: Mål for, i hvilken grad en test kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over tid, når den udføres efter samme protokol. Pålideligheden bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og repeterbarhed inden for laboratorier (14).

Analyseserie: En analyseserie består af et eller flere testkemikalier, der testes samtidig med en opløsningsmiddel-/bærestofkontrol og med en positiv kontrol.

Følsomhed: Andel af alle positive/aktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Følsomheden er et mål for nøjagtigheden af en test, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en tests relevans (14).

SI: Stimuleringsindeks. Relative værdier for det geometriske gennemsnit af fluorescensintensitet i kemisk behandlede celler sammenlignet med celler behandlet med opløsningsmiddel.

Opløsningsmiddel-/bærestofkontrol: En ubehandlet prøve, som indeholder alle

komponenterne fra et testsystem, herunder det anvendte opløsningsmiddel/bærestof. Den anvendes til at fastlægge basislinjeresponsen for de prøver, som er behandlet med testkemikaliet opløst eller stabilt dispergeret i det samme opløsningsmiddel/bærestof. Når denne prøve testes med en samtidig mediekontrol, viser den også, hvorvidt opløsningsmidlet eller bærestoffet interagerer med testsystemet.

Specificitet: Andel af alle negative/inaktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Specificiteten er et mål for nøjagtigheden af en test, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en tests relevans (14).

Farvebuffer: En phosphatbufret fysiologisk saltopløsning indeholdende 5 % føtalt kalveserum.

Stof: Et grundstof og forbindelser heraf, i naturlig tilstand eller industrielt fremstillet, herunder sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, der kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning.

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

De Forenede Nationers globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – UN GHS): Et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, faresætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljøet (16).

UVCB: Stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

Gyldig test: En test, der anses for at være tilstrækkeligt relevant og pålideligt til et bestemt formål, og som er baseret på videnskabeligt forsvarlige principper. En test er aldrig gyldig i absolut forstand, men kun i relation til et bestemt formål (14).

Tillæg 2.2

KOMPETENCESTOFFER

Forud for den rutinemæssige brug af den test, der er beskrevet i dette tillæg til forsøgsmetode B.71, bør laboratorierne godtgøre deres tekniske kompetence ved at opnå den forventede U-SENSTM-forudsigelse på korrekt vis for de ti stoffer, der anbefales i tabel 1, og ved at opnå de CV70- og EC150-værdier, der falder ind under de respektive referenceintervaller for otte ud af de ti kompetencestoffer. Disse kompetencestoffer er udvalgt således, at de repræsenterer responsområdet for hudsensibiliseringsfare. Andre udvælgelseskriterier var, at kemikalierne er kommercielt tilgængelige, at der foreligger in vivo-referencedata af høj kvalitet, og at der er genereret in vitro-data af høj kvalitet med U-SENSTM-forsøgsmetoden. Der foreligger ligeledes offentliggjorte referencedata for U-SENSTM-forsøgsmetoden (1) (8).

Tabel 1: Anbefalede stoffer til godtgørelse af teknisk kompetence i tilknytning til U-SENSTM-testen

Kompetencestoffer	CAS RN	Fysisk form	In vivo-forudsigelse ¹	U-SENS TM Opløsnings- middel/ bærestof	U-SENS TM CV70- reference- interval i µg/ml ²	U-SENS TM EC150- reference- interval i µg/ml ²
4-Phenylenediamin	106-50-3	Fast stof	Sensibiliserende stof (stærk)	Komplet medium ³	<30	Positiv (≤10)
Picrylsulfonsyre	2508-19-2	Væske	Sensibiliserende stof (stærk)	Komplet medium	>50	Positiv (≤50)
Diethylmaleat	141-05-9	Væske	Sensibiliserende stof (moderat)	DMSO	10-100	Positiv (≤20)
Resorcinol	108-46-3	Fast stof	Sensibiliserende stof (moderat)	Komplet medium	>100	Positiv (≤50)
Kanelalkohol	104-54-1	Fast stof	Sensibiliserende stof (svag)	DMSO	>100	Positiv (10-100)
4-Allylanisol	140-67-0	Væske	Sensibiliserende stof (svag)	DMSO	>100	Positiv (<200)
Sakkarin	81-07-2	Fast stof	Ikke-sensibiliserende	DMSO	>200	Negativ (>200)
Glycerol	56-81-5	Væske	Ikke-sensibiliserende	Komplet medium	>200	Negativ (>200)
Mælkesyre	50-21-5	Væske	Ikke-sensibiliserende	Komplet medium	>200	Negativ (>200)
Salicylsyre	69-72-7	Fast stof	Ikke-sensibiliserende	DMSO	>200	Negativ (>200)

Forkortelser: CAS RN = Registernummer i Chemical Abstracts Service

- ¹ Forudsigelser af in vivo-fare (og -styrke) er baseret på LLNA-data (1) (8). In vivo-styrken er beregnet ud fra de kriterier, der foreslås af ECETOC (17).
- ² På baggrund af historiske observerede værdier (1) (8).
- ³ Komplet medium: RPMI-1640 medium suppleret med 10 % føtalt kalveserum, 2 mM L-glutamin, 100 enheder/ml penicillin og 100 µg/ml streptomycin (8).

Tillæg 3

IN VITRO-HUDSENSIBILISERING: IL-8 LUC-ASSAY

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

1. I modsætning til assays, der analyserer ekspresionen af celleoverflademarkører, måler IL8-Luc-assay ændringerne i IL-8-ekspresionen, et cytokin knyttet til aktiveringen af dendritiske celler (DC). I IL-8 reporter-cellelinjen udledt af THP-1 (THP-G8, fastlagt på grundlag af human akut monocytisk leukæmi-cellelinjen THP-1) måles IL-8-ekspresionen efter eksponering for sensibiliserende stoffer (1). Ekspresionen af luciferase anvendes derefter til at understøtte differentieringen mellem sensibiliserende stoffer og ikke-sensibiliserende stoffer.
2. IL-8 Luc-assayet er blevet evalueret i en valideringsundersøgelse (2) udført af det japanske center for validering af alternative metoder (JaCVAM), **økonomi-, handels- og industriministeriet (METI)**, og det japanske selskab **for alternativer til dyreforsøg (JSAAE)** og efterfølgende underkastet en uafhængig peer review (3) under ledelse af JaCVAM og sundheds-, arbejds- og velfærdsministeriet (MHLW) med støtte fra **det internationale samarbejde om alternative forsøgsmetoder (ICATM)**. På grundlag af al tilgængelig dokumentation og input fra myndigheder og interessenter anses IL-8 Luc-assayet for at være nyttigt som en del af IATA til støtte for differentieringen mellem sensibiliserende stoffer og ikke-sensibiliserende stoffer med henblik på fareklassificering og mærkning. Der findes i litteraturen eksempler på anvendelsen af data fra IL-8 Luc-assayet i kombination med andre oplysninger (4) (5) (6).
3. Det viste sig, at IL-8 Luc-assayet kunne overføres til laboratorier med erfaring i celledyrkning og luciferasemåling. Reproducerbarheden inden for og mellem laboratorier var på henholdsvis 87,7 % og 87,5 % (2). Data genereret i valideringsundersøgelsen (2) og andre publicerede værker (1) (6) viser, at IL-8 Luc-assayet i modsætning til LLNA bedømte 118 ud af 143 kemikalier som positive eller negative og 25 kemikalier som ikke entydige, og nøjagtigheden af IL-8 Luc-assayet med hensyn til differentiering mellem hudsensibiliserende stoffer (UN GHS-/CLP-kategori 1) og ikke-sensibiliserende stoffer (UN GHS-/CLP-ingen kategori) er 86 % (101/118) med en følsomhed på 96 % (92/96) og en specificitet på 41 % (9/22). Når der ses bort fra stoffer, der ligger uden for det nedenfor beskrevne anvendelsesområde (punkt 5), bedømte IL-8 Luc-assayet 113 ud af 136 kemikalier som positive eller negative og 23 kemikalier som ikke entydige, og nøjagtigheden af IL-8 Luc-assayet er 89 % (101/113) med en følsomhed på 96 % (92/96) og en specificitet på 53 % (9/17). Ved hjælp af de i Urbisch et al. (7) nævnte humandata bedømte IL-8 Luc-assayet 76 ud af 90 kemikalier som positive eller negative og 14

kemikalier som ikke entydige, og nøjagtigheden er 80 % (61/76), følsomheden er 93 % (54/58) og specificiteten er 39 % (7/18). Når der ses bort fra stoffer, der ligger uden for anvendelsesområdet, bedømte IL-8 Luc-assayet 71 ud af 84 kemikalier som positive eller negative og 13 kemikalier som ikke entydige, og nøjagtigheden er 86 % (61/76) med en følsomhed på 93 % (54/58) og en specificitet på 54 % (7/18). Det er mere sandsynligt, at falsk negative forudsigelser i forbindelse med IL-8 Luc-assayet vil forekomme i tilknytning til kemikalier med lav til moderat hudsensibiliserende styrke (UN GHS-/CLP-underkategori 1B) end i tilknytning til kemikalier med en høj hudsensibiliserende styrke (UN GHS-/CLP-underkategori 1A) (6). Samlet set fremgår det af oplysningerne, at IL-8 Luc-assayet kan bidrage til identificeringen af hudsensibiliseringsfarer. Den angivne nøjagtighed for IL-8 Luc-assayet som en enkeltstående test er kun vejledende, da testen bør vurderes i kombination med andre informationskilder i forbindelse med en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 7 og 8 i den generelle indledning. Når forsøgsmetoder uden brug af dyr vurderes i tilknytning til hudsensibilisering, bør man desuden huske på, at LLNA og andre dyreforsøg måske ikke fuldt ud afspejler situationen hos mennesker.

4. På grundlag af de data, der er tilgængelige i øjeblikket, har IL-8 Luc-assayet vist sig at være relevant for testkemikalier, der omfatter en række forskellige organiske funktionelle grupper, reaktionsmekanismer, hudsensibiliseringsstyrker (som fastlagt ved in vivo-undersøgelser) og fysisk-kemiske egenskaber (2) (6).
5. Selv om IL-8 Luc-assayet anvender X-VIVO™ 15 som opløsningsmiddel, bedømte det korrekt kemikalier med $\log K_{ow} > 3,5$ og kemikalier med en vandopløselighed på omkring 100 µg/ml som beregnet ved EPI Suite™, og dens kapacitet til at påvise sensibiliserende stoffer med dårlig vandopløselighed er bedre end for IL-8 Luc-assayet, der anvender dimethylsulfoxid (DMSO) som opløsningsmiddel (2). De negative resultater for testkemikalier, der ikke er opløst ved 20 mg/ml, kan dog medføre falsk negative resultater på grund af den manglende evne til at opløses i X-VIVO™ 15. De negative resultater for disse kemikalier bør derfor ikke tages i betragtning. Der sås en høj andel af falske negative for anhydrider i valideringsundersøgelsen. På grund af cellelinjens begrænsede metaboliske kapacitet (8) og testbetingelserne kan pro-haptener (stoffer, der kræver metabolisk aktivering) og præ-haptener (stoffer, der aktiveres ved oxidation) desuden give negative resultater i assayet. Selv om de negative resultater for stoffer, der mistænkes for at være præ-/pro-haptener, skal fortolkes med forsigtighed, bedømte IL-8 Luc-assayet imidlertid 11/11 præ-haptener, 6/6 pro-haptener, og 6/8 præ-/pro-haptener i IL-8 Luc-assay-datasættet korrekt (2). På grundlag af den seneste detaljerede gennemgang af tre forsøg uden brug af dyr (DPRA, KeratinoSens™ og h-CLAT) til påvisning af præ- og pro-haptener (9), og på grundlag af den omstændighed, at THP-G8-celler, der anvendes i IL-8 Luc-assayet er en cellelinje, der er udledt af THP-1, som anvendes i h-CLAT, kan IL-8

Luc-assayet også bidrage til at øge følsomheden af forsøg uden brug af dyr og til at påvise præ- og pro-haptener i kombination med andre test. De overfladeaktive stoffer, der er blevet testet indtil videre, gav (falsk) positive resultater uanset deres type (f.eks. kationaktiv, anionaktiv eller nonionaktiv). Endelig kan kemikalier, der interfererer med luciferase, maskere dets aktivitet/måling, hvilket forårsager en tydelig inhibering eller øget luminescens (10). Eksempelvis findes der rapporter om, at fytoøstrogenkoncentrationer på over 1 µM forstyrrede luminescenssignalerne i andre luciferasebaserede reporter-genassays på grund af overaktivering af luciferasereporter-genet. Som følge heraf skal den luciferaseekspression, som er opnået ved høje koncentrationer af fytoøstrogener eller forbindelser, der mistænkes for at forårsage fytoøstrogenlignende aktivering af luciferasereporter-genet, undersøges nøje (11). Det fremgår af det ovenstående, at overfladeaktive stoffer, anhydrider og kemikalier, der interfererer med luciferase, ligger uden for anvendelsesområdet for dette assay. I de tilfælde, hvor der foreligger beviser for, at IL-8 Luc-assayet ikke kan anvendes på andre specifikke kategorier af testkemikalier, bør denne metode ikke anvendes til disse specifikke kategorier.

6. Som beskrevet ovenfor understøtter IL-8 Luc-assayet differentieringen mellem hudsensibiliserende og ikke-sensibiliserende stoffer. Der er behov for yderligere arbejde, fortrinsvis baseret på humane data, med henblik på at bestemme, om IL-8 Luc-resultaterne kan bidrage til styrkevurderingen, når den betragtes i kombination med andre informationskilder.
7. Definitioner findes i tillæg 3.1.

PRINCIP FOR TESTEN

8. IL-8 Luc-assayet anvender en human monocytisk leukæmi-cellelinje, THP-1, der er erhvervet fra American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Ved hjælp af denne cellelinje udviklede afdelingen for dermatologi, Tohoku University School of Medicine, en THP-1-udledt IL-8 reporter-cellelinje, THP-G8, der indeholder henholdsvis Stable Luciferase Orange (SLO) og Stable Luciferase Red (SLR) luciferasegenerne under kontrol af IL-8- og glyceraldehyd 3-fosfat dehydrogenase (GAPDH)-aktivatorer (1). Dette giver mulighed for kvantitativ måling af luciferasegeninduktion ved hjælp af veldokumenterede lysproducerende luciferasesubstrater som en indikator for aktiviteten af IL-8 og GAPDH i celler efter eksponering for sensibiliserende kemikalier.
9. Assaysystemet med to farver omfatter luciferase, der udsender orange lys (SLO; $\lambda_{\text{max}} = 580 \text{ nm}$) (12) for genekspressionen af IL-8-aktivatoren, og luciferase, der udsender rødt lys (SLR; $\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$) (13) for genekspressionen af den interne kontrolaktivator, GAPDH. De to luciferaser udsender forskellige farver, når de reagerer med firefly d-

luciferin, og deres luminescens måles samtidigt i en et-trinsreaktion ved at dele emissionen fra assayblandingen ved hjælp af et optisk filter (14) (tillæg 3.2).

10. THP-G8-cellerne behandles med testkemikaliet i 16 timer, hvorefter SLO luciferaseaktiviteten (SLO-LA), der afspejles i IL-8-aktivatoraktiviteten, og SLR luciferaseaktiviteten (SLR-LA), der afspejles i GAPDH-aktivatoraktiviteten, måles. For at gøre forkortelserne letforståelige betegnes SLO-LA og SLR-LA som henholdsvis IL8LA og GAPLA. Tabel 1 indeholder en beskrivelse af de udtryk, der er knyttet til luciferaseaktiviteten i IL-8 Luc-assayet. De målte værdier anvendes til at beregne den standardiserede IL8LA-værdi (nIL8LA), som er forholdet mellem IL8LA og GAPLA; induktionen af nIL8LA (Ind-IL8LA), der er forholdet mellem det aritmetiske gennemsnit af firdobbelt-målte værdier for nIL8LA i THP-G8-celler behandlet med et testkemikalie og værdierne for nIL8LA i ubehandlede THP-G8-celler; og inhiberingen af GAPLA (Inh-GAPLA), der er forholdet mellem det aritmetiske gennemsnit af firdobbelt-målte værdier for GAPLA i THP-G8-celler behandlet med et testkemikalie og værdierne for GAPLA i ubehandlede THP-G8-celler, og anvendes som en indikator for cytotoxisk effekt.

Tabel 1: Beskrivelse af de udtryk, der er knyttet til luciferaseaktiviteten i IL-8 Luc-assayet

Forkortelser	Definition
GAPLA	SLR luciferaseaktivitet, der afspejler GAPDH-aktivatoraktiviteten
IL8LA	SLO luciferaseaktivitet, der afspejler IL-8-aktivatoraktiviteten
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA i THP-G8-celler behandlet med kemikalier/nIL8LA i ubehandlede celler
Inh-GAPLA	GAPLA i THP-G8-celler behandlet med kemikalier/GAPLA i ubehandlede celler
CV05	Den laveste koncentration af kemikaliet, ved hvilken Inh-GAPLA bliver < 0,05.

11. Der stilles ydeevnestandarder (15) til rådighed for at lette valideringen af ændrede in vitro-IL-8-luciferaseforsøg svarende til IL-8 Luc-assayet og for at muliggøre en rettidig ændring af OECD-testvejledning 442E, så de kan medtages. OECD's Mutual Acceptance of Data (MAD) vil kun være garanteret for forsøg, der er valideret i henhold til ydeevnestandarderne, hvis disse test er gennemgået og medtaget i OECD-testvejledning 442E (16).

PÅVISNING AF KOMPETENCE

12. Forud for den rutinemæssige brug af det forsøg, der er beskrevet i dette tillæg til forsøgsmetode B.71, bør laboratorierne godtgøre deres tekniske kompetence ved hjælp af

de ti kompetencestoffer, der er opført i tillæg 3.3. i overensstemmelse med Good *in vitro* Method Practices (17). Desuden bør brugerne af testen opretholde en historisk database over data, der er genereret ved hjælp af reaktivitetskontrollerne (jf. punkt 15) og ved hjælp af de positive kontroller og opløsningsmiddel-/bærestofkontrollerne (jf. punkt 21-24), og de bør anvende disse data til at bekræfte, at reproducerbarheden af testen i deres laboratorium opretholdes over tid.

FREMGANGSMÅDE

13. Der foreligger standardprocedurer (SOP) for IL-8 Luc-assayet, og de bør anvendes ved udførelsen af testen (18). Laboratorier, der er villige til at udføre testen, kan erhverve recombinant THP-G8-cellelinjerne fra GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan, når de har underskrevet en materialeoverførselsaftale (MTA) i overensstemmelse med betingelserne i OECD-skabelonen. Følgende punkter indeholder en beskrivelse af de vigtigste komponenter og fremgangsmåder i assayet.

Præparering af celler

14. THP-G8-cellelinjen fra GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan, bør anvendes til udførelse af IL-8 Luc-assayet (jf. punkt 8 og 13). Ved modtagelsen opformeres cellerne (f.eks. 2-4 opformeringer) og opbevares frosne som en homogen stamme. Celler fra denne stamme kan opformeres højst 12 gange eller i højst seks uger. Det medium, der anvendes til opformering, er RPMI-1640 dyrkningsmedium indeholdende 10 % føtalt kalveserum (FBS), antibiotika-/antimykotikumopløsning (1 000 U/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin og 0,25 µg/ml amfotericin B i 0,85 % fysiologisk saltopløsning) (f.eks. GIBCO Cat#15240-062), 0,15 µg/ml Puromycin (f.eks. CAS:58-58-2) og 300 µg/ml G418 (f.eks. CAS:108321-42-2).
15. Inden cellerne anvendes til testning, bør de valideres ved at gennemføre en reaktivitetskontrol. Denne kontrol bør foretages 1-2 uger eller 2-4 generationer efter optøning ved hjælp af den positive kontrol, 4-nitrobenzylbromid (4-NBB) (CAS:100-11-8, ≥ 99 % renhed) og den negative kontrol, mælkesyre (LA) (CAS:50-21-5, ≥ 85 % renhed). 4-NBB bør give en positiv respons på Ind-IL8LA ($\geq 1,4$), mens mælkesyre bør give en negativ respons på Ind-IL8LA ($< 1,4$). Kun celler, der består reaktivitetskontrollen, anvendes til assayet. Reaktivitetskontrollen bør foretages i henhold til de fremgangsmåder, der er beskrevet i punkt 22-24.
16. Når THP-G8-cellerne skal anvendes til testning, podes de ved en tæthed på 2 til 5×10^5 celler/ml, og forkultiveres i dyrkningsflasker i 48-96 timer. På dagen for gennemførelse af testen vaskes celler høstet fra dyrkningsflasken med RPMI-1640 indeholdende 10 % FBS uden nogen antibiotika, og genopslæmmes derefter med RPMI-1640 indeholdende 10 %

FBS uden nogen antibiotika ved 1×10^6 celler/ml. Derefter fordeles cellerne i en fladbundet sort 96-brønds plade (f.eks. Costar Cat#3603) med 50 μ l (5×10^4 celler/brønd).

Fremstilling af testkemikalie og kontrolstoffer

17. Testkemikaliet og kontrolstofferne fremstilles på dagen for testen. I forbindelse med IL-8 Luc-assayet opløses testkemikalierne i X-VIVO™ 15, et kommercielt tilgængeligt serumfrit medium (Lonza, 04-418Q), til slutkoncentrationen på 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 tilsættes til 20 mg af testkemikaliet (uanset kemikaliets opløselighed) i et mikrocentrifugerør, og der fyldes op til et volumen på 1 ml, hvorefter der omrystes kraftigt, og der rystes i en rotor ved en maksimumshastighed på 8 o/min. i 30 min. ved rumtemperatur på omkring 20 °C. Hvis kemikalier i fast form fortsat er uopløselige, ultralydsbehandles de desuden, indtil kemikaliet er opløst fuldstændigt eller er stabilt dispergeret. Når testkemikalierne er opløselige i X-VIVO™ 15, fortyndes opløsningen med en faktor 5 med X-VIVO™ 15 og anvendes som en X-VIVO™ 15 stamopløsning af testkemikaliet (4 mg/ml). Når testkemikalierne ikke er opløselige i X-VIVO™ 15, rystes blandingen igen i rotoren i mindst 30 min., hvorefter den centrifugeres ved 15 000 o/min. ($\approx 20\ 000g$) i 5 min. Den fremkaldte supernatant anvendes som en X-VIVO™ 15 stamopløsning af testkemikaliet. Hvis der benyttes andre opløsningsmidler som f.eks. DMSO, vand eller dyrkningsmediet, bør der fremlægges tilstrækkeligt videnskabeligt belæg for dette. Den detaljerede procedure for opløsning af kemikalier fremgår af tillæg 3.5. De X-VIVO™ 15-opløsninger, der er beskrevet i punkt 18-23, blandes i forholdet 1:1 (v/v) med de cellesuspensioner, der er forberedt i den fladbundede sorte 96-brønds plade (jf. punkt 16).
18. Den første analyseserie er beregnet til at bestemme den cytotoksiske koncentration og undersøge kemikaliernes hudsensibiliserende potentiale. Ved hjælp af X-VIVO™ 15 foretages der seriefortyndinger af X-VIVO™ 15 stamopløsningerne af testkemikalierne med en fortyndingsfaktor to (jf. tillæg 3.5) ved hjælp af en 96-brønds blok (f.eks. Costar Cat#EW-01729-03). Derefter tilsættes 50 μ l/brønd fortyndet opløsning til 50 μ l af cellesuspensionen i en fladbundet sort 96-brønds plade. Når testkemikalierne er opløselige i X-VIVO™ 15, ligger slutkoncentrationerne for testkemikalierne i intervallet fra 0,002 til 2 mg/ml (tillæg 3.5). Når testkemikalierne ikke er opløselige i X-VIVO™ 15 ved 20 mg/ml, anvendes kun fortyndingsfaktorer i intervallet fra 2 til 2^{10} , selv om de faktiske slutkoncentrationer af testkemikaliet forbliver usikre og afhænger af den mættede koncentration af testkemikalierne i X-VIVO™ 15 stamopløsningen.
19. I de efterfølgende analyseserier (dvs. det andet, tredje og fjerde replikat) laves X-VIVO™ 15 stamopløsningen i en koncentration, der er fire gange højere end koncentrationen for cellelevedygtighed 05 (CV05; den laveste koncentration, ved hvilken Inh-GAPLA bliver $<0,05$) i det første forsøg. Hvis Inh-GAPLA ikke falder under 0,05 ved den højeste

koncentration i den første analyseserie, laves X-VIVO™ 15 stamopløsningen som den højeste koncentration ved første analyseserie. Koncentrationen af CV05 beregnes ved at dividere koncentrationen af stamopløsningen i første analyseserie med fortyndingsfaktoren for CV05 (X) (fortyndingsfaktor CV05 (X); den fortyndingsfaktor, der er nødvendig for at fortynde stamopløsningen til CV05) (jf. tillæg 3.5). For testkemikalier, der ikke er opløselige i X-VIVO ved 20 mg/ml, fastsættes CV05 som koncentrationen af stamopløsningen $\times 1/X$. Til 2.-4. analyseserie fremstilles en ny stamopløsning på 4 x CV50 (tillæg 3.5).

20. Seriefortyndinger af X-VIVO™ 15 anden stamopløsning foretages med en fortyndingsfaktor på 1,5 ved hjælp af en 96-brønds blok. Derefter tilsættes 50 µl/brønd fortyndet opløsning til 50 µl af cellesuspensionen i brøndene i en fladbundet sort 96-brønds plade. Hver enkelt koncentration af hvert testkemikalie bør testes i fire brønde. Prøverne blandes derefter på en pladeryster og inkuberes i 16 timer ved 37 °C og 5 % CO₂, hvorefter luciferaseaktiviteten måles som beskrevet nedenfor.
21. Kontrolkulturen med opløsningsmiddel er blandingen af 50 µl/brønd af X-VIVO™ 15 og 50 µl/brønd af cellesuspensionen i RPMI-1640 indeholdende 10 % FBS.
22. Den anbefalede positive kontrol er 4-NBB. 20 mg af 4-NBB fremstilles i et 1,5-ml mikrocentrifugeglas, hvortil der tilsættes X-VIVO™ 15 op til 1 ml. Glasset omrystes kraftigt, og der rystes i en rotor ved en maksimumshastighed på 8 o/min. i mindst 30 min. Efter centrifugering ved 20 000g i 5 min. fortyndes supernatanten med en faktor 4 med X-VIVO™ 15, og 500 µl af den fortyndede supernatant overføres til en 96-brønds blok. Den fortyndede supernatant fortyndes med X-VIVO™ 15 med faktorer på 2 og 4, og 50 µl af opløsningen tilsættes til 50 µl af THP-G8-cellesuspensionen i brøndene i den fladbundede 96-brønds plade (tillæg 3.6). Hver enkelt koncentration af den positive kontrol bør testes i fire brønde. Pladen rystes på en pladeryster og inkuberes i en CO₂ inkubator i 16 timer (37 °C, 5 % CO₂), hvorefter luciferaseaktiviteten måles som beskrevet i punkt 29.
23. Den anbefalede negative kontrol er mælkesyre LA. 20 mg af mælkesyren fremstilles i et 1,5-ml mikrocentrifugeglas, hvortil der tilsættes X-VIVO™ 15 op til 1 ml (20 mg/ml). 20 mg/ml af mælkesyreopløsningen fortyndes med en faktor 5 med X-VIVO™ 15 (4 mg/ml). 500 µl af denne 4 mg/ml mælkesyreopløsning overføres til en brønd i en 96-brønds blok. Denne opløsning fortyndes med en faktor 2 med X-VIVO™ 15 og fortyndes derefter igen med en faktor 2 for at opnå 2 mg/ml og 1 mg/ml opløsninger. 50 µl af disse tre opløsninger og bærestofkontrollen (X-VIVO™ 15) tilsættes til 50 µl af THP-G8-cellesuspensionen i brøndene i den fladbundede sorte 96-brønds plade. Hver enkelt koncentration af den negative kontrol testes i fire brønde. Pladen rystes på en pladeryster og inkuberes i en CO₂ inkubator i 16 timer (37 °C, 5 % CO₂), hvorefter luciferaseaktiviteten måles som beskrevet i punkt 29.

24. Andre egnede positive kontroller kan anvendes, hvis der foreligger historiske data, som kan anvendes til at udlede sammenlignelige acceptkriterier for analyseserien.
25. Der bør træffes forholdsregler for at undgå, at flygtige testkemikalier fordamper, og for at undgå krydskontaminering med testkemikalier mellem brøndene, f.eks. ved at forsegle pladerne inden inkubation med testkemikalierne.
26. De negative testkemikalier og kontrolkulturen med opløsningsmiddel kræver 2-4 analyseserier, for at der kan udledes en positiv eller negativ forudsigelse (jf. tabel 2). De enkelte analyseserier foretages på forskellige dage med en frisk X-VIVO™ 15 stamopløsning af testkemikalier og uafhængigt høstede celler. Cellerne kan stamme fra den samme opformering.

Målinger af luciferaseaktivitet

27. Luminescens måles ved hjælp af et 96-brønds mikropladeluminometer med optiske filtre, f.eks. Phelios (ATTO, Tokyo, Japan), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Germany) og ARVO-serien (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Luminometeret skal kalibreres for hver test for at sikre reproducerbarhed (19). Denne kalibrering kan foretages ved hjælp af rekombinante luciferaser, der udsender orange og rødt lys.
28. 100 µl opvarmet Tripluc® Luciferase assay reagens (Tripluc) overføres til hver enkelt brønd på pladen indeholdende cellesuspensionen behandlet med kemikallet eller ubehandlet. Pladen rystes i 10 min. ved rumtemperatur på omkring 20 °C. Pladen anbringes i luminometeret, så luciferaseaktiviteten kan måles. Bioluminescensen måles i 3 sekunder uden (F0) og med (F1) det optiske filter. Anvendes der alternative indstillinger, f.eks. som følge af den anvendte luminometermodel, bør dette begrundes.
29. Parametrene for hver enkelt koncentration beregnes ud fra de målte værdier, f.eks. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA og den gennemsnitlige $\pm$ SD (standardafvigelse) for IL8LA, den gennemsnitlige $\pm$ SD for GAPLA, den gennemsnitlige $\pm$ SD for nIL8LA, den gennemsnitlige $\pm$ SD for Ind-IL8LA, den gennemsnitlige $\pm$ SD for Inh-GAPLA og 95 % konfidensintervallet for Ind-IL8LA. Definitionerne af de parametre, der anvendes i dette punkt, findes i henholdsvis tillæg I og IV.
30. Forud for måling opnås farveopløsningsevnen i flerfarvede reporterassays generelt ved hjælp af detektorer (luminometer og pladelæser) udstyret med optiske filtre såsom kontrastfiltre (passage af lange eller korte bølgelængder) eller båndpasfiltre. Transmissionskoefficienterne for filtrene for hver enkelt bioluminescenssignalfarve bør kalibreres forud for testning, jf. tillæg 3.2.

DATA OG RAPPORTERING

Dataevaluering

31. Kriterierne for en positiv/negativ afgørelse kræver for hver analyseserie følgende:

- En IL-8 Luc-assay-forudsigelse betragtes som positiv, hvis et testkemikalie har et Ind-IL8LA $\geq 1,4$, og den nedre grænse for 95 % konfidensintervallet for Ind-IL8LA $\geq 1,0$.
- En IL-8 Luc-assay-forudsigelse betragtes som negativ, hvis et testkemikalie har et Ind-IL8LA $< 1,4$, og/eller den nedre grænse for 95 % konfidensintervallet for Ind-IL8LA $< 1,0$.

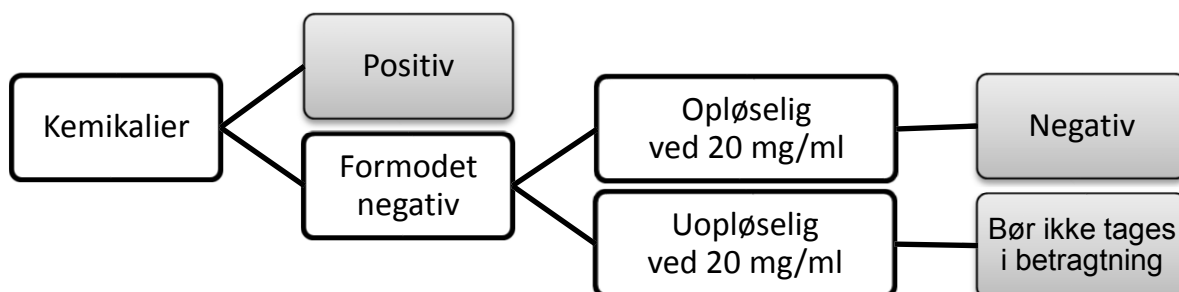
Forudsigelsesmodel

32. Testkemikalier, der giver to positive resultater i 1., 2., 3. eller 4. analyseserie, identificeres som positive, mens de testkemikalier, der giver tre negative resultater i 1., 2., 3. eller 4. analyseserie, identificeres som formodet negative (tabel 2). Blandt de formodede negative kemikalier betragtes kemikalier, der er opløst i koncentrationen 20 mg/ml i X-VOVO™ 15 som negative, mens kemikalier, der ikke er opløst i koncentrationen 20 mg/ml i X-VOVO™ 15 ikke bør tages i betragtning (figur 1).

Tabel 2: Kriterier for identificering af positive og formodet negative

1. analyseserie	2. analyseserie	3. analyseserie	4. analyseserie	Endelig forudsigelse
Positiv	Positiv	-	-	Positiv
	Negativ	Positiv	-	Positiv
		Negativ	Positiv	Positiv
		Negativ	Formodet negativ	
Negativ	Positiv	Positiv	-	Positiv
		Negativ	Positiv	Positiv
		Negativ	Formodet negativ	
	Negativ	Positiv	Positiv	Positiv
		Negativ	Formodet negativ	
		Negativ	-	Formodet negativ

Figur 1: Forudsigelsesmodel for den endelige bedømmelse



Acceptkriterier

33. Følgende acceptkriterier bør være opfyldt, når IL-8 Luc-assayet anvendes:

- Ind-IL8LA bør være over 5,0 ved mindst en koncentration af den positive kontrol, 4-NBB, i hver enkelt analyseserie.
- Ind-IL8LA bør være under 1,4 ved enhver koncentration af den negative kontrol, mælkesyre, i hver enkelt analyseserie.
- Data fra plader, for hvilke GAPLA i kontrolbrøndene med celler og Tripluc, men uden kemikalier er mindre end 5 gange værdien for en brønd, der kun indeholder testmedium (50 µl/brønd RPMI-1640 indeholdende 10 % FBS og 50 µl/brønd X-VIVO™ 15), bør forkastes.
- Data fra plader, for hvilke Inh-GAPLA for alle koncentrationer af test- eller kontrolkemikalierne er mindre end 0,05, bør kasseres. I dette tilfælde bør den første test gentages, så den højeste koncentration af den gentagne test er den laveste slutkoncentration for den foregående test.

Testrapport

34. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalier

Stof med kun én bestanddel:

- kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer

- fysisk udseende, vandopløselighed, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt
- renhed, urenheders kemiske identitet i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.
- eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)
- opløselighed i X-VIVO™ 15. For kemikalier, der er opløselige i X-VIVO™ 15, uanset om der ses bundfald eller flotation efter centrifugering
- testede koncentrationer
- opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt
- begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof for de enkelte testkemikalier, hvis X-VIVO™ 15 ikke er blevet anvendt.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

- så vidt muligt kendetegnet ved f.eks. kemisk identitet (jf. ovenfor), renhed, kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber (jf. ovenfor) i det omfang, det er muligt
- fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt
- molekylvægt eller tilsyneladende molekylvægt i tilfælde af blandinger/polymerer med kendt sammensætning eller andre oplysninger, der er relevante for undersøgelsens gennemførelse
- eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)
- opløselighed i X-VIVO™ 15. For kemikalier, der er opløselige i X-VIVO™ 15, uanset om der ses bundfald eller flotation efter centrifugering
- testede koncentrationer
- opbevaringsforhold og stabilitet i det omfang, det er muligt
- begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof for de enkelte testkemikalier, hvis X-VIVO™ 15 ikke er blevet anvendt.

Kontrol

Positiv kontrol:

- kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer

- fysisk udseende, vandopløselighed, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt og relevant
- renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.
- eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)
- testede koncentrationer
- opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt
- reference til historiske positive kontrolresultater, der udviser passende acceptkriterier for analyseserie, hvis det er relevant.

Negativ kontrol:

- kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre og/eller andre identifikatorer
- renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.
- fysisk udseende, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber ved brug af andre negative kontroller end dem, der er nævnt i testvejledningen, i det omfang, det er muligt
- opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt
- begrundelse for valg af opløsningsmiddel for de enkelte testkemikalier.

Testbetingelser

- navn og adresse på sponsoren, testfaciliteten og undersøgelseslederen
- beskrivelse af den anvendte test
- anvendt cellelinje, opbevaringsforhold og kilde (f.eks. det anlæg, hvorfra den er anskaffet)
- partinummer og oprindelse af FBC, leverandørnavn, partinummer på den sorte 96-brønds fladbundede plade og partinummer på Tripluc reagensen
- opformeringsnummer og den celletæthed, der er anvendt til testning
- den anvendte celletællingsmetode til opformering inden testen, og de foranstaltninger, der er truffet for at sikre en homogen cellefordeling
- Det anvendte luminometer (f.eks. model), herunder instrumentindstillinger, det anvendte luciferasesubstrat og dokumentation for hensigtsmæssige luminescensmålinger baseret på den kontrol, der er beskrevet i tillæg 3.2

- den fremgangsmåde, der er anvendt til at påvise laboratoriets kompetence til at anvende forsøgsmetoden (f.eks. ved testning af kompetencestoffer) eller til at påvise reproducerbare resultater af forsøgsmetoden over tid.

Forsøgsmetode

- antal replikater og foretagne analyseserier
- koncentrationer af testkemikaliet, tilsætningsprocedure og eksponeringstid (hvis forskellig fra det anbefalede)
- beskrivelse af de anvendte evaluerings- og beslutningskriterier
- beskrivelse af de benyttede undersøgelsesacceptkriterier
- beskrivelse af eventuelle ændringer i forsøgsmetoden.

Resultater

- målinger af IL8LA og GAPLA
- beregninger af nIL8LA, Ind-IL8LA og Inh-GAPLA
- 95 % konfidensinterval for Ind-IL8LA
- en graf, der viser dosis/respons-kurver for induktion af luciferaseaktivitet og levedygtighed
- beskrivelse af eventuelle andre relevante observationer, hvis det er relevant.

Diskussion af resultater

- diskussion af de resultater, der er opnået med IL-8 Luc-assayet
- vurdering af resultaterne af assayet inden for rammerne af en IATA, hvis der foreligger andre relevante oplysninger.

Konklusion

LITTERATUR

- (1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K og Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci* 124:359-69.
- (2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc-assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc-assay. Series on Testing og Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Tilgjengelig på: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Tilgjengelig på: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Tilgjengelig på: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H og Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:371-9.
- (6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y og Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29:1816-30.
- (7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71:337-51.
- (8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N og Itagaki H. (2010). A comparative

evaluation of *in vitro* skin sensitisation test: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

- (9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A og Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.
- (10) Thorne N, Inglese J og Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.
- (11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>.
- (12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M og Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.
- (13) Viviani VR, Bechara EJ, og Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, og expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.
- (14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M og Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.
- (15) OECD (2017). Publiceres senere - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, France
- (16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Paris, France.
- (17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic

- Cooperation and Development, Paris. Tilgængelig på:
http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.
- (18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol. Tilgængelig på:
http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.
- (19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, og Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochem Photobiol* 86:1046-9.
- (20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OECD, Paris, France.
- (21) De Forenede Nationer, 2015. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1 Tilgængelig på:
http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Tillæg 3.1

DEFINITIONER

Nøjagtighed: Overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for testens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for "konkordans", forstået som den andel af korrekte udfald, som en forsøgsmetode fører til (16).

AOP (Adverse Outcome Pathway): Sekvens af begivenheder fra den kemiske struktur af et målkemikalie eller en gruppe af ensartede kemikalier gennem den molekylære udløsende begivenhed til et in vivo -resultat af betydning (20).

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

CV05: Cellelevedygtighed 05, dvs. den minimumskoncentration, ved hvilken kemikalier viser mindre end 0,05 af Inh-GAPLA.

FInSLO-LA: Forkortelse, der er anvendt i valideringsrapporten og i tidligere publikationer vedrørende IL-8 Luc-assayet for at henvise til Ind-IL8LA. Jf. definitionen af Ind-IL8LA.

GAPLA: Luciferaseaktiviteten i stabil luciferaserød (SLR) ($\lambda_{\text{maks.}} = 630 \text{ nm}$), reguleret af GAPDH-vækstfremmeren, viser cellelevedygtigheden og det levedygtige celleantal.

Fare: Den iboende egenskab ved et stof eller en situation, som kan have en skadelig virkning, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende stof.

IATA (integreret tilgang til testning og vurdering): En struktureret tilgang, der bruges til identifikation af farer (potentiale), farebeskrivelse (styrke) og/eller sikkerhedsvurdering (potentiale/styrke og eksponering) af et kemikalie eller en gruppe af kemikalier, som på strategisk vis integrerer og vægter alle relevante data som grundlag for lovgivningsmæssige beslutninger om mulige farer og/eller risici og/eller behovet for yderligere målrettede og derfor færrest mulige test.

II-SLR-LA: Forkortelse, der er anvendt i valideringsrapporten og i tidligere publikationer vedrørende IL-8 Luc-assayet for at henvise til Inh-GAPLA. Jf. definitionen af Inh-GAPLA.

IL-8 (Interleukin-8): et cytokin udledt af endotele celler, fibroblaster, keratinocytter, makrofager og monocytter, der forårsager kemotaksi af neutrofiler og T-cellelymfocytter.

IL8LA: Luciferaseaktiviteten i stabil luciferaseorange (SLO) ($\lambda_{\text{maks.}} = 580 \text{ nm}$), reguleret af IL-8-promoterens.

Ind-IL8LA: Foldinduktion for IL8LA. Denne værdi opnås ved at dividere nIL8LA for THP-G8-celler behandlet med kemikalier med nIL8LA for ikke-stimulerede THP-G8-celler

og betegner kemikaliers induktion af IL-8-promoteraktivitet.

Inh-GAPLA: Inhibering af GAPLA. Opnås ved at dividere GAPLA for THP-G8 behandlet med kemikalier med GAPLA for ubehandlede THP-G8 og betegner kemikaliers cytotoxiske effekt.

Minimumsinduktionstærskel (MIT): Den laveste koncentration, ved hvilken et kemikalie opfylder de positive kriterier.

Blanding: Blanding eller opløsning, der består af to eller flere stoffer.

Stof med kun én bestanddel: Et stof, der defineres ved dets mængdemæssige sammensætning, hvori en hovedbestanddel udgør mindst 80 % (w/w).

Stof med flere bestanddele: Et stof, der defineres ved dets mængdemæssige sammensætning, hvori mere end en af hovedbestanddelene er til stede i en koncentration på ≥ 10 % (w/w) og < 80 % (w/w). Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en fremstillingsproces. Forskellen mellem en blanding og et stof med forskellige bestanddele er, at blandingen er fremstillet ved blanding af to eller flere stoffer uden kemisk reaktion. Et stof, der består af flere forskellige bestanddele, er resultatet af en kemisk reaktion.

nIL8LA: SLO luciferaseaktiviteten, der afspejler IL-8-promoteraktiviteten (IL8LA) standardiseret ved hjælp af SLR luciferaseaktiviteten, der afspejler GAPDH-promoteraktiviteten (GAPLA). Denne værdi betegner IL-8-promoteraktiviteten efter hensyntagen til cellelevedygtigheden eller celleantallet.

nSLO-LA: Forkortelse, der er anvendt i valideringsrapporten og i tidligere publikationer vedrørende IL-8 Luc-assayet for at henvise til nIL8LA. Jf. nIL8LA for en definition.

Positiv kontrol: Et replikat, som indeholder alle komponenterne fra et forsøgssystem og er behandlet med et stof, som vides at inducere en positiv respons. For at sikre at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør den positive respons ikke være overdrevent stor.

Præ-haptener: Kemikalier, der bliver sensibiliserende stoffer via abiotisk omdannelse.

Pro-haptener: Kemikalier, der kræver en enzymaktivering for at udløse det hudsensibiliserende potentiale.

Relevans: Beskrivelse af sammenhængen mellem testen og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang testen måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Testens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af relevansen (16).

Pålidelighed: Mål for, i hvilken grad en test kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over tid, når den udføres efter samme protokol. Pålideligheden bedømmes ved

beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og repeterbarhed inden for laboratorier (16).

Analyseserie: En analyseserie består af et eller flere testkemikalier, der testes samtidig med en opløsningsmiddel-/bærestofkontrol og med en positiv kontrol.

Følsomhed: Andel af alle positive/aktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Følsomheden er et mål for nøjagtigheden af en test, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en tests relevans (16).

SLO-LA: Forkortelse, der er anvendt i valideringsrapporten og i tidligere publikationer vedrørende IL-8 Luc-assayet for at henvise til IL8LA. Jf. definitionen af IL8LA.

SLR-LA: Forkortelse, der er anvendt i valideringsrapporten og i tidligere publikationer vedrørende IL-8 Luc-assayet for at henvise til GAPLA. Jf. definitionen af GAPLA.

Opløsningsmiddel-/bærestofkontrol: En ubehandlet prøve, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem, herunder det anvendte opløsningsmiddel/bærestof. Den anvendes til at fastlægge basislinjeresponsen for de prøver, som er behandlet med testkemikaliets opløst eller stabilt dispergeret i det samme opløsningsmiddel/bærestof. Når denne prøve testes med en samtidig mediekontrol, viser den også, hvorvidt opløsningsmidlet eller bærestoffet interagerer med testsystemet.

Specificitet: Andel af alle negative/inaktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Specificiteten er et mål for nøjagtigheden af en test, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en tests relevans (16).

Stof: Kemiske stoffer og forbindelser heraf, naturlige eller industrielt fremstillede, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, som kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning.

Afspændingsmiddel: Også kaldet for overfladeaktivt stof. Dette stof, f.eks. et vaske- og rengøringsmiddel, kan reducere overfladespændingen i en væske og dermed give den mulighed for at skumme eller trænge ind i faste stoffer. Det kaldes også for befugtningsmiddel. (TG437)

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne metode.

THP-G8: En IL-8-reportercellelinje, der anvendes i IL-8 Luc-assayet. Den humane makrofaglignende cellelinje THP-1 blev transfekteret med henholdsvis SLO og SLR luciferasegener under kontrollen af IL-8- og GAPDH-promotere.

De Forenede Nationers globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (United Nations Globally Harmonized System of Classification and

Labelling of Chemicals – UN GHS): System til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, faresætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljøet (21).

UVCB: Stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

Gyldig forsøgsmetode: En test, der anses for at være tilstrækkeligt relevant og pålideligt til et bestemt formål, og som er baseret på videnskabeligt forsvarlige principper. En test er aldrig gyldig i absolut forstand, men kun i relation til et bestemt formål.

Tillæg 3.2

PRINCIP FOR MÅLING AF LUCIFERASEAKTIVITETEN OG BESTEMMELSE AF OPTISKE FILTRES TRANSMISSIONSKOEFFICIENTER FOR SLO OG SLR

MultiReporter Assay System – Tripluc – kan anvendes sammen med et luminometer af mikropladetypen med et flerfarvepåvisningssystem, der kan forsynes med et optisk filter (f.eks. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Det optiske filter, der anvendes til måling, er 600–620 nm filter, der tillader passage af lange eller korte bølgelængder, eller 600–700 nm båndpasfiltre.

Måling af tofarvede luciferaser med et optisk filter

Dette er et eksempel på brug af Phelios AB-2350 (ATTO). Dette luminometer er udstyret med et 600 nm filter, der tillader passage af lange bølgelængder (R60 HOYA Co.), 600 nm LP (filter 1) til opsplitning af SLO ($\lambda_{\text{maks.}} = 580 \text{ nm}$) og SLR ($\lambda_{\text{maks.}} = 630 \text{ nm}$) luminescens.

Med henblik på at bestemme transmissionskoefficienterne for 600 nm LP måles først ved hjælp af rensede SLO og SLR luciferaseenzym i) intensiteten af SLO og SLR bioluminescensintensiteten uden filter (F0), ii) SLO og SLR bioluminescensintensiteten, der passerer igennem 600 nm LP (filter 1), og derefter iii) beregnes transmissionskoefficienterne for 600 nm LP til SLO og SLR som anført nedenfor.

Transmissionskoefficienter		Forkortelse	Definition
SLO	Filter 1 Transmissions- koefficienter	$\kappa_{O_{R60}}$	Filterets transmissions- koefficient for SLO
SLR	Filter 1 Transmissions- koefficienter	$\kappa_{R_{R60}}$	Filterets transmissions- koefficient for SLR

Når intensiteten af SLO og SLR i prøven defineres som henholdsvis O og R, beskrives i) intensiteten af lys uden filter (alle optiske) F0 og ii) intensiteten af lys, der udsendes via 600 nm LP (filter 1) F1, som nedenfor.

$$F0=O+R$$

$$F1=\kappa_{O_{R60}} \times O + \kappa_{R_{R60}} \times R$$

Disse formler kan omformuleres således:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Ved hjælp af de beregnede transmissionskoefficienter (κO_{R60} og κR_{R60}) og de målte F0 og F1, kan du beregne O- og R-værdien som følger:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Materialer og metoder til bestemmelse af transmissionskoefficient

1) Reagenser

Enkelte rensede luciferaseenzymer:

Lyofiliseret rensed SLO enzym

Lyofiliseret rensed SLR enzym

(som i forbindelse med valideringsarbejdet blev anskaffet fra GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan med cellelinje THP-G8)

Assay reagens:

Tripluc® Luciferase assay reagens (f.eks. fra TOYOBO Cat#MRA-301)

Medium: til luciferase assay (30 ml, opbevaret ved 2-8 °C)

Reagens	Konc.	Slutkonc. i medium	Krævet mængde
RPMI-1640	-	-	27 ml
FBS	-	10 %	3 ml

2) Fremstilling af enzymopløsning

Opløs lyofiliseret rensed luciferaseenzym i et reagensglas ved at tilsætte 200 µl 10 ~ 100 mM Tris/HCl eller Hepes/HCl (pH 7.5 ~ 8.0) suppleret med 10 % (w/v) glycerol, del enzymopløsningen i 10 µl delprøver i 1,5 ml engangsrør, og opbevar dem i en fryser ved -80 °C. Den nedfrosne enzymopløsning kan anvendes i op til seks måneder. Ved brug tilsættes 1 ml af mediet til luciferase assay (RPMI-1640 med 10 % FBS) til hvert enkelt rør indeholdende enzymopløsninger (fortyndet enzymopløsning), og de opbevares på is for at forhindre deaktivering.

3) Måling af bioluminescens

Optø Tripluc® Luciferase assay reagens (Tripluc), og opbevar det ved rumtemperatur enten i vandbad eller ved rumtemperatur. Start luminometeret, 30 min. inden målingen påbegyndes, så fotomultiplikatoren kan stabiliseres. Overfør 100 µl af den fortyndede enzymopløsning til en sort 96-brønds plade (fladbundet) (SLO referenceprøven til #B1, #B2, #B3, SLR referenceprøven til #D1, #D2, #D3). Overfør dernæst 100 µl opvarmet Tripluc til hver enkelt brønd på pladen indeholdende den fortyndede enzymopløsning ved hjælp af en pipetman. Omryst pladen i 10 min. ved rumtemperatur (omkring 25 °C) ved hjælp af en pladeryster. Opstår der bobler i opløsningerne i brøndene, fjernes de. Anbring pladen i luminometeret, og mål luciferaseaktiviteten. Bioluminescensen måles i 3 sekunder uden (F0) og med (F1) det optiske filter.

Transmissionskoefficienten for det optiske filter blev beregnet som følger:

Transmissionskoefficient (SLO (κ_{OR60})) = (#B1 af F1+ #B2 af F1+ #B3 af F1) / (#B1 af F0+ #B2 af F0+ #B3 af F0)

Transmissionskoefficient (SLR (κ_{RR60})) = (#D1 af F1+ #D2 af F1+ #D3 af F1) / (#D1 af F0+ #D2 af F0+ #D3 af F0)

Beregnete transmissionskoefficienter anvendes til alle målinger, der foretages ved hjælp af det samme luminometer.

Kvalitetskontrol af udstyr

De fremgangsmåder, der er beskrevet i IL-8 Luc-protokollen, bør anvendes (18).

Tillæg 3.3

KOMPETENCESTOFFER

Forud for den rutinemæssige brug af de forsøg, der er beskrevet i dette tillæg til forsøgsmetode B.71, bør laboratorierne godtgøre deres tekniske kompetence ved at opnå den forventede IL-8 Luc-assay-forudsigelse for de ti stoffer, der anbefales i tabel 1, og ved at opnå værdier, der falder inden for de respektive referenceintervaller for mindst otte ud af ti kompetencestoffer (udvalgt til at repræsentere reaktionsintervallet for hudsensibiliseringsfare). Andre udvælgelseskriterier var, at kemikalierne er kommercielt tilgængelige, og at der foreligger in vivo-referencedata af høj kvalitet samt in vitro-data af høj kvalitet, der er genereret med IL-8 Luc-assayet. Der foreligger ligeledes offentliggjorte referencedata for IL-8 Luc-assayet (6) (1).

Tabel 1: Anbefalede stoffer til godtgørelse af teknisk kompetence i tilknytning til IL-8 Luc-assayet

Kompetencestoffer	CAS nr.	Fysisk tilstand	Opløselighed i X-VIVO15 ved 20 mg/ml	In vivo-forudsigelse ¹	IL-8 Luc-forudsigelse ²	Referenceinterval (µg/ml) ³	
						CV05 ⁴	IL-8 Luc MIT ⁵
2,4-Dinitrochlorbenzen	97-00-7	Fast stof	Uopløselig	Sensibiliserende stof (Ekstrem)	Positiv	2,3-3,9	0,5-2,3
Formaldehyd	50-00-0	Væske	Opløseligt	Sensibiliserende stof (Stærk)	Positiv	9-30	4-9
2-Mercaptobenzothiazol	149-30-4	Fast stof	Uopløselig	Sensibiliserende stof (Moderat)	Positiv	250-290	60-250
Ethylendiamin	107-15-3	Væske	Opløseligt	Sensibiliserende stof (Moderat)	Positiv	500-700	0,1-0,4
Ethylenglycoldimethacrylat	97-90-5	Væske	Uopløselig	Sensibiliserende stof (Svag)	Positiv	>2 000	0,04-0,1
4-Allylanisol (Estragol)	140-67-0	Væske	Uopløselig	Sensibiliserende stof (Svag)	Positiv	>2 000	0,01-0,07
Streptomycinsulfat	3810-74-0	Fast stof	Opløseligt	Ikke-sensibiliserende	Negativ	>2 000	>2 000
Glycerol	56-81-5	Væske	Opløseligt	Ikke-sensibiliserende	Negativ	>2 000	>2 000
Isopropanol	67-63-0	Væske	Opløseligt	Ikke-sensibiliserende	Negativ	>2 000	>2 000

Forkortelser: CAS-nr. = Registernummer i Chemical Abstracts Service.

¹ In vivo-styrken er beregnet ud fra de kriterier, der foreslås af ECETOC (19).

² På baggrund af historiske observerede værdier (1) (6).

³ CV05 og IL-8 Luc MIT blev beregnet ved hjælp af den vandopløselighed, som EPI SuiteTM resulterede i.

⁴ CV05: Den minimumskoncentration, ved hvilken kemikalier viser mindre end 0,05 af Inh-GAPLA.

⁵ MIT: De laveste koncentrationer, ved hvilke et kemikalie opfylder de positive kriterier.

Tillæg 3.4

INDEKSER OG BEDØMMELSESKRITERIER**nIL8LA (nSLO-LA)**

j-ende repetition (j = 1-4) af i-ende koncentration (i = 0-11) måles for henholdsvis IL8LA (SLO-LA) og GAPLA (SLR-LA). Den standardiserede IL8LA-værdi betegnes som nIL8LA (nSLO-LA) og defineres som:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij} / GAPLA_{ij}$$

Dette er den grundlæggende måleenhed i dette assay.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Foldstigningen for den gennemsnitlige nIL8LA (nSLO-LA) for repetition i den i-ende koncentration sammenlignet med 0-koncentrationen, Ind-IL8LA, er det primære mål for dette assay. Dette forhold kan sættes på følgende formel:

$$\text{Ind-IL8LA}_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j} \right\}$$

Det førende laboratorium har foreslået, at en værdi på 1,4 svarer til et positivt resultat for det testede kemikalie. Denne værdi er baseret på undersøgelsen af det førende laboratoriums historiske data. Dataforvaltningsteamet anvendte dernæst denne værdi i alle faser af valideringsundersøgelsen. Det primære resultat, Ind-IL8LA, er forholdet mellem to aritmetiske gennemsnit, som det fremgår af ligningen.

95 % konfidensinterval (95 % CI)

95 % konfidensintervallet (95 % CI) baseret på forholdet kan anses for at vise nøjagtigheden af dette primære resultat. Den nedre grænse for 95 % CI ≥ 1 indikerer, at nIL8LA ved den i-ende koncentration er betydeligt højere end ved kontrolkultur med opløsningsmiddel. 95 % CI kan fastsættes på flere måder. Vi anvendte den metode, der er kendt som Fiellers teorem, i denne undersøgelse. Dette teorem for 95 % konfidensinterval udregnes ved hjælp af følgende formel:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A} \right],$$

hvor

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}, \quad B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}, \quad C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4,$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}, \quad sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \bar{x}_0)^2,$$

$$n_{yi} = 4, \quad \bar{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij}), \quad sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yi} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \bar{y}_i)^2.$$

$t_{0.975(v)}$ er 97,5 percentilen af den centrale t-fordeling med v af frihedsgraden, hvor

$$v = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0} \right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA er forholdet mellem den gennemsnitlige GAPLA (SLR-LA)-værdi for repetitionen af den i-ende koncentration sammenlignet med den gennemsnitlige GAPLA (SLR-LA)-værdi for kontrolkulturen med opløsningsmiddel og kan sættes på følgende formel:

$$Inh - GAPLA_i = \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j}\}.$$

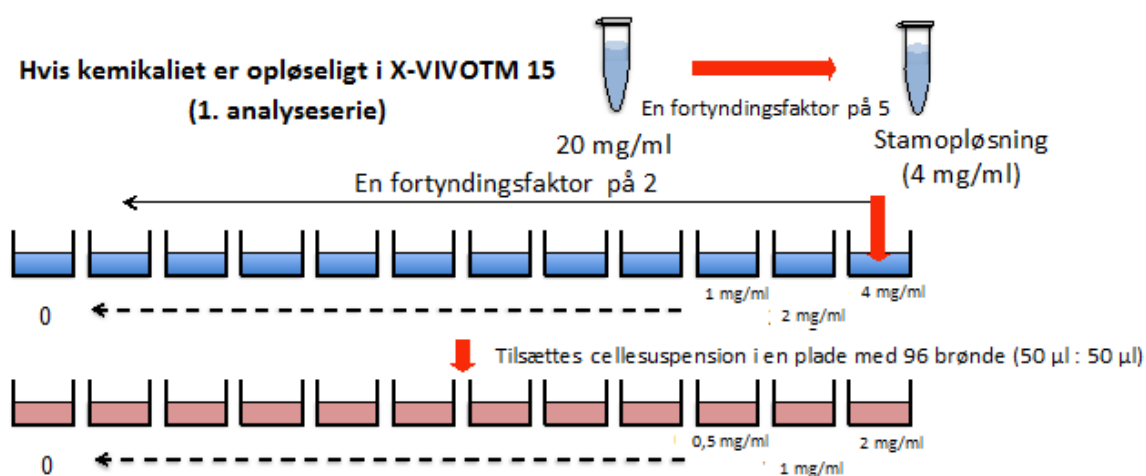
Da GAPLA er denominatoren for nIL8LA, forårsager ekstremt små værdier en stor variation i nIL8LA. Derfor kan Ind-IL8LA-værdier med ekstremt små værdier for Inh-GAPLA (under 0,05) anses for at være meget upræcise.

Tillæg 3.5

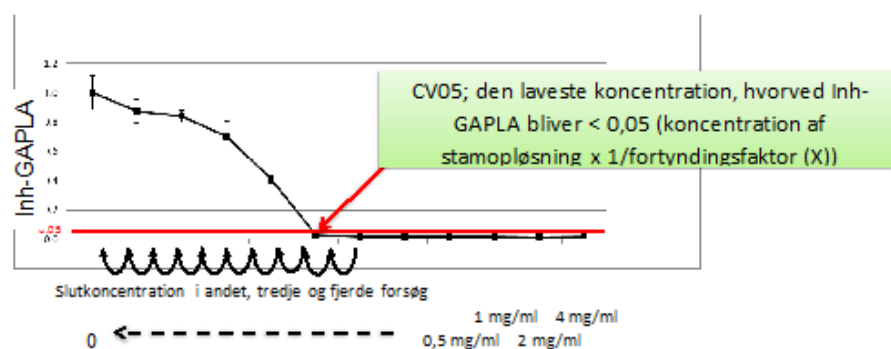
SKEMA OVER METODERNE TIL OPLØSNING AF KEMIKALIER TIL IL-8 LUC-ASSAYET

- a) For kemikalier, der er opløselige i X-VIVO™ 15 ved 20 mg/ml

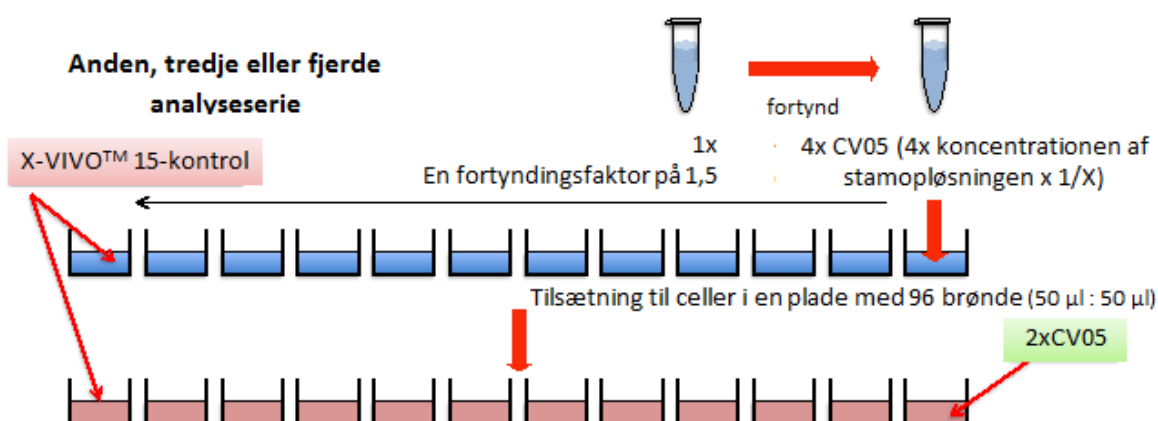
Hvis kemikaliet er opløseligt i X-VIVOTM 15
(1. analyseserie)



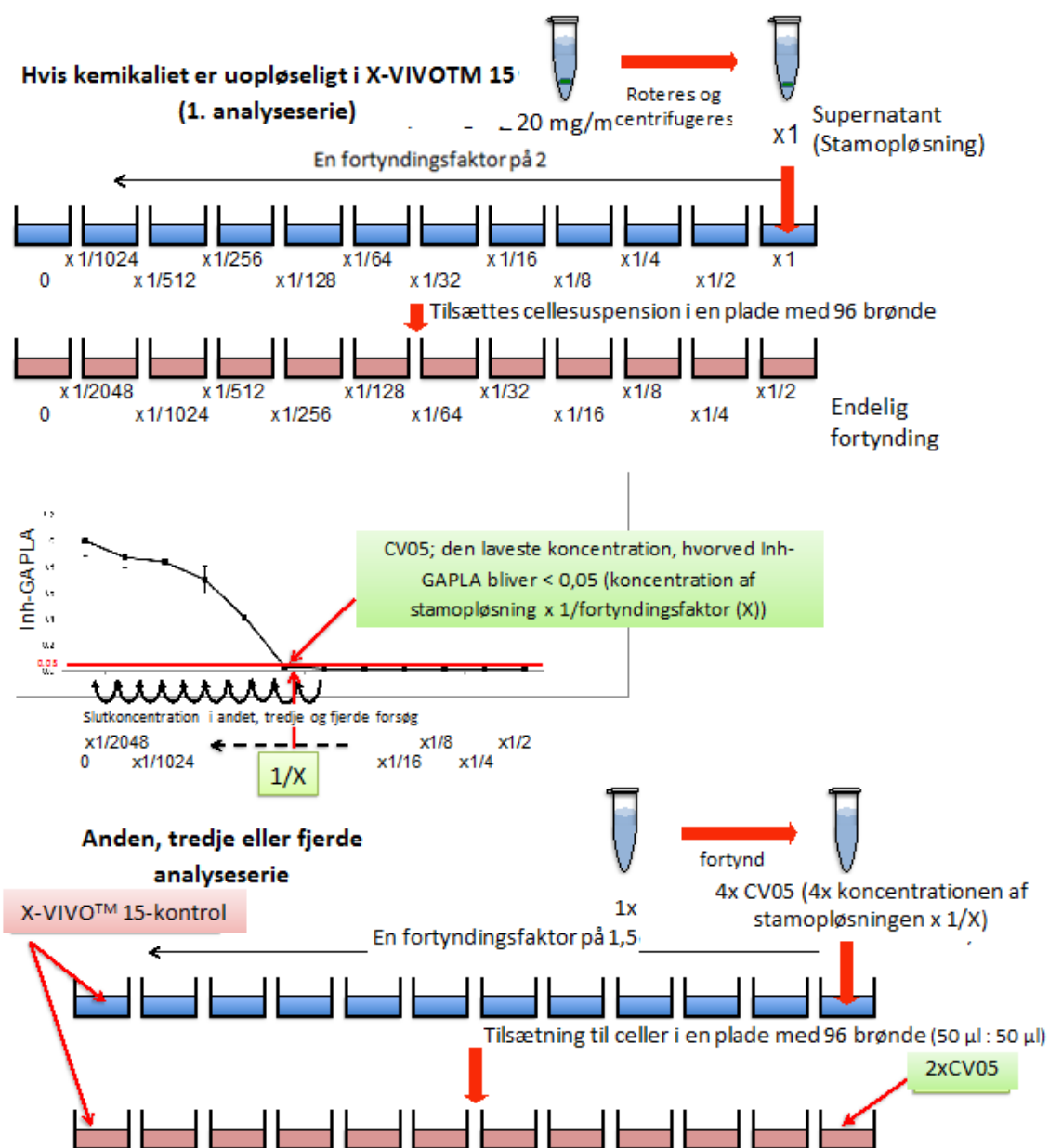
Bestemmelse af højeste koncentration i følgende forsøg

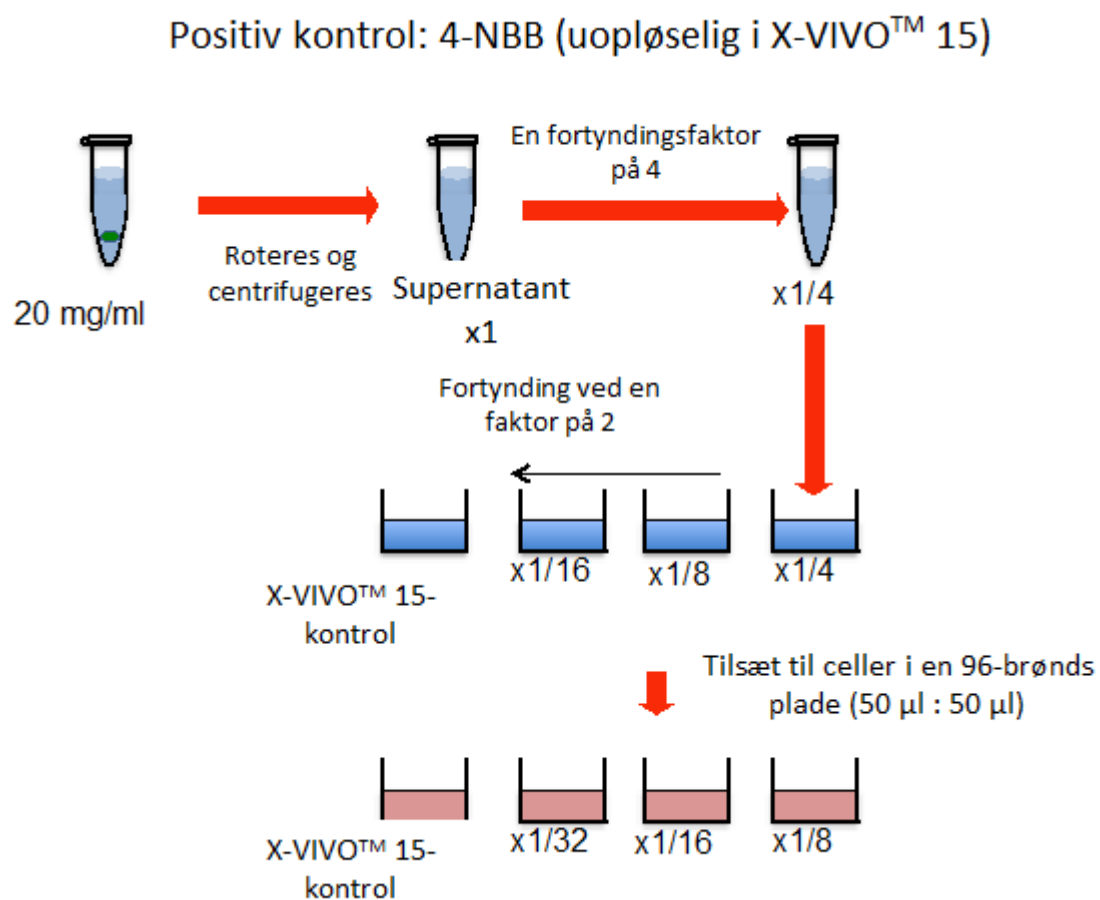


Anden, tredje eller fjerde
analyseserie



b) For kemikalier, der ikke er opløselige i X-VIVOTM 15 ved 20 mg/ml



Tillæg 3.6**SKEMA OVER METODEN TIL OPLØSNING AF 4-NBB TIL DEN POSITIVE KONTROL I FORBINDELSE MED IL-8 LUC-ASSAYET**

9) I del C indsættes følgende kapitler:

**"C.52 MEDAKA EXTENDED ONE GENERATION REPRODUCTION TEST (MEOGRT)
(JAPANSK RISFISK UDVIDET ENKELTGENERATIONS REPRODUKTIONSTEST)**

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (TG) 240 (2015). Medaka Extended One Generation Test (MEOGRT) beskriver en detaljeret forsøgsmetode baseret på fisk, der er blevet eksponeret i flere generationer, for at finde frem til data, der er relevante for miljøtruslen og risikovurderingen af kemikalier, herunder kemikalier, der mistænkes for at være hormonforstyrrende stoffer. Eksponeringen i MEOGRT fortsætter indtil klækning (indtil to uger efter befrugtning) i anden (F2) generation. Der skal gennemføres yderligere undersøgelser for at begrunde det hensigtsmæssige i at forlænge F2-generationen efter klækning. På nuværende tidspunkt foreligger der ikke tilstrækkelige oplysninger til, at det kan fastslås, at de relevante betingelser eller kriterier for at forlænge F2-generationen foreligger. Denne forsøgsmetode kan imidlertid blive opdateret, i takt med at nye oplysninger og data tages i betragtning. Eksempelvis kan vejledning om forlængelse af F2-generationen være nyttig under visse omstændigheder (f.eks. kemikalier med et højt biokoncentrationspotentiale eller indikationer på virkninger gennem flere generationer i andre taxa). Denne forsøgsmetode kan anvendes til at vurdere kemikaliers, herunder potentielle hormonforstyrrende stoffers, potentielle kroniske virkninger hos fisk. EC_x (effekt-koncentration for x % virkning) er den koncentration, der har en virkning på x % på testorganismer inden for en angiven eksponeringsperiode sammenlignet med en kontrol. Metoden lægger primært vægt på potentielle populationsrelevante virkninger (dvs. negative indvirkninger på overlevelse, udvikling, vækst og reproduktion) ved beregningen af en No Observed Effect Concentration (koncentration uden observeret effekt – (NOEC)) eller en effekt-koncentration (EC_x), selv om det bør noteres, at EC_x-tilgange sjældent er egnede til større undersøgelser af denne art, hvor forøgelse af antallet af testkoncentrationer med henblik på bestemmelse af den ønskede EC_x kan være upraktisk og ligeledes kan give anledning til væsentlige bekymringer omkring dyrevelfærd på grund af det store antal dyr, der anvendes. Når det gælder kemikalier, der ikke kræver en vurdering over flere generationer, eller kemikalier, der ikke er potentielt hormonforstyrrende stoffer, kan andre forsøgsmetoder være mere hensigtsmæssige (1). Den japanske risfisk er velegnet til brug i denne forsøgsmetode på grund af dens korte livscyklus og muligheden for at bestemme dens genetiske køn (2), som anses for at være et afgørende element i denne forsøgsmetode. De specifikke metoder og de observerede endepunkter, der er beskrevet i denne metode, finder kun anvendelse på japansk risfisk. Andre små fiskearter (f.eks. zebrafisk) kan tilpasses en tilsvarende forsøgsprotokol.

2. Denne forsøgsmetode måler flere biologiske endepunkter. Der lægges primært vægt på potentielle negative effekter på populationsrelevante parametre, herunder overlevelse, udvikling, vækst og reproduktion. Med henblik på at skaffe mekanistisk information og etablere forbindelser mellem resultaterne af andre former for felt- og laboratorieundersøgelser, hvor der foreligger *a posteriori* evidens for, at et kemikalie har potentielle hormonforstyrrende virkninger (*f.eks.* androgen eller østrogen aktivitet i andre forsøg og assays), kan der sekundært indhentes andre nyttige oplysninger ved at måle *vitellogenin* (*vtg*) mRNA (eller vitellogeninprotein, VTG), fænotypiske sekundære kønskarakteristika (SSC) i tilknytning til genetisk køn samt histopatologisk evaluering. Det bør bemærkes, at såfremt et kemikalie eller dets metabolitter ikke mistænkes for at være hormonforstyrrende stoffer, er det måske ikke nødvendigt at måle disse sekundære endepunkter, og mindre ressourcekrævende og dyreintensive undersøgelser kan være mere hensigtsmæssige (1). De definitioner, der er anvendt i denne forsøgsmetode, er anført i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

3. På grund af det begrænsede antal kemikalier, der testes, og det begrænsede antal laboratorier, der er involveret i valideringen af dette ret komplekse assay, forventes det, at forsøgsmetoden, når der foreligger et tilstrækkeligt antal undersøgelser til, at virkningen af dette undersøgelsesdesign kan fastslås, vil blive gennemgået og om nødvendigt revideret i lyset af de indhøstede erfaringer. Dataene kan anvendes på niveau 5 i OECD's Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (3). Forsøgsmetoden starter med, at voksne fisk (F0-generationen) eksponeres for testkemikallet i reproduktionsfasen. Eksponeringen fortsætter gennem udviklingen og reproduktionen i F1-generationen og klækningen af F2-generationen; dette assay gør det dermed muligt at evaluere såvel strukturelle som aktiveringsrelaterede endokrine reaktionsveje. Der kan gennemføres en weight of evidence-analyse ved fortolkningen af de endokrinrelaterede endepunkter.
4. Testen bør omfatte et passende antal individer for at sikre et tilstrækkeligt grundlag for evalueringen af reproduktionsrelevante endepunkter (jf. tillæg 3), samtidig med at det sikres, at det antal dyr, der anvendes, er det minimum, der kræves af hensyn til dyrevelfærden. I lyset af det store antal forsøgsdyr, der anvendes, er det vigtigt nøje at afveje behovet for at gennemføre testen mod eksisterende data, der måske allerede indeholder relevant information om mange af endepunkterne i MEOGRT. Nogen hjælp i denne henseende kan hentes fra OECD Fish Toxicity Testing Framework (1).

5. Forsøgsmetoden er primært udformet med henblik på at klarlægge virkningerne af et enkelt stof. Hvis et forsøg med en blanding er påkrævet, bør det imidlertid overvejes, om det vil give resultater, som er egnede til det tilsigtede lovmæssige formål.
6. Inden testen påbegyndes, er det vigtigt at indhente oplysninger om testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber, navnlig for at gøre det muligt at fremstille stabile kemikalieopløsninger. Det er også nødvendigt, at der findes en tilstrækkeligt følsom analysemetode til kontrol af koncentrationerne af testkemikaliets.

PRINCIP FOR TESTEN

7. Testen indledes med at eksponere kønsmodne hanner og hunner (mindst 12 uger efter befrugtning) i ynglepar i 3 uger, og i denne periode fordeles testkemikaliets i forældregenerationens (F0) organismer i henhold til dets toksikokinetiske reaktionsmåde. Så tæt som muligt på den første dag i den fjerde uge indsamles æggene, så F1-generationen kan påbegyndes. Under opdræt af F1-generationen (i alt 15 uger) vurderes klækningsevnen og overlevelsen. Derudover udtages der prøver af fisk ved 9-10 uger efter befrugtning med henblik på udviklingsmæssige endepunkter, og gydningen vurderes i tre uger fra 12 til 14 uger efter befrugtning. En F2-generation påbegyndes efter den tredje uges reproduktionsvurdering, og den opdrættes, indtil klækningen er fuldført.

VALIDERINGSKRITERIER FOR TESTEN

8. Følgende kriterier for testens gyldighed finder anvendelse:
 - Koncentrationen af opløst oxygen bør være ≥ 60 % af luftmætningsværdien under hele testforløbet.
 - Den gennemsnitlige vandtemperatur under hele testen bør ligge mellem 24 og 26 °C. Kortvarige afvigelser fra gennemsnittet i de enkelte akvarier bør ikke være på mere end 2 °C.
 - Den gennemsnitlige frugtbarhed i kontrolgrupperne i hver generation (F0 og F1) bør være højere end 20 æg pr. par/dag. Fertiliteten af alle de æg, der gydes under vurderingen, bør være højere end 80 %. Derudover bør 16 af de anbefalede 24 kontrolynglepar (> 65 %) gyde over 20 æg pr. par/dag.
 - Æggenes klækningsevne bør være ≥ 80 % (gennemsnit) i kontrolgrupperne (i hver enkelt F1- og F2-generation).
 - Overlevelse efter klækning indtil 3 uger efter befrugtning og fra 3 uger efter befrugtning indtil afslutning af F1-generationen (dvs. 15 uger efter befrugtning) bør være henholdsvis ≥ 80 % (gennemsnit) og ≥ 90 % (gennemsnit) i kontrolgrupperne (F1).

- Der skal foreligge dokumentation for, at koncentrationerne af testkemikaliet i opløsning på tilfredsstillende måde er opretholdt inden for ± 20 % af gennemsnittet af de målte værdier.

Med hensyn til vandtemperaturen bør replikater inden for en behandling, selv om det ikke er et validitetskriterium, ikke være statistisk forskellige fra hinanden, og behandlingsgrupperne inden for testen bør ikke være statistisk forskellige fra hinanden (baseret på daglige temperaturmålinger, idet der ses bort fra kortvarige afvigelser).

9. Selv om der observeres nedsat reproduktion i grupper udsat for højere eksponering, bør der være en tilstrækkelig reproduktion i mindst den tredjehøjeste gruppe og alle grupper derunder af F0 til at fylde klækningsinkubatorerne. Desuden bør der være en tilstrækkelig embryonoverlevelse i den tredjehøjeste og lavere eksponeringsgrupper i F1 til at muliggøre en endepunktsevaluering ved prøveudtagelsen af næsten fuldvoksne individer (jf. punkt 36 og 38 og tillæg 9). Derudover bør der være mindst minimal overlevelse efter klækning (~ 20 %) i den højeste eksponeringsgruppe i F1. Der er ikke tale om validitetskriterier som sådan, men om anbefalinger, der gør det muligt at beregne solide NOEC.
10. Hvis der observeres en afvigelse fra validitetskriterierne for testen, bør konsekvenserne holdes op imod forsøgsresultaternes pålidelighed, og disse afvigelser og overvejelser bør fremgå af testrapporten.

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

11. Normalt laboratorieudstyr og i særdeleshed følgende:

- a) oxygenmeter og pH-meter
- b) udstyr til bestemmelse af vandets hårdhed og alkalinitet
- c) egnet apparatur til temperaturkontrol og helst løbende overvågning
- d) beholdere fremstillet af et kemisk inert materiale og med passende kapacitet i forhold til den anbefalede belastningsgrad og bestandtæthed (se tillæg 3)
- e) vægt med tilstrækkelig nøjagtighed (dvs. nøjagtighed på $\pm 0,5$ mg).

Vand

12. Som testvand kan anvendes vand af enhver beskaffenhed, hvori den art, der anvendes i testen, udviser passende langtidsoverlevelse og vækst. Vandets kvalitet bør være ensartet i hele testperioden. For at sikre, at fortyndingsvand ikke får urimelig indflydelse på testresultaterne (f.eks. ved at danne et kompleks med testkemikaliet) eller indvirker negativt på ynglebestandens præstationer, bør der regelmæssigt udtages prøver til analyse. Målinger af tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), de vigtigste anioner og kationer

(f.eks. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), pesticider, samlet mængde organisk kulstof og opslæmmede faste stoffer bør foretages, f.eks. hver sjette måned, såfremt man ved, at fortyndingsvandet har en relativt konstant kvalitet. I tillæg 2 er anført nogle kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand. Vandets pH skal ligge i intervallet 6,5-8,5, men bør i løbet af en given test ligge inden for et interval på $\pm 0,5$ pH-enheder.

Eksponeringsystem

13. Det design og de materialer, der anvendes til eksponeringssystemet, er ikke angivet. Glas, rustfrit stål eller andre kemisk inerte materialer bør anvendes til konstruktion af testsystemet, der ikke må være blevet kontamineret under tidligere forsøg. I forbindelse med denne test kan et velegnet eksponeringssystem bestå af et kontinuerligt gennemstrømningssystem (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Testopløsninger

14. Stamopløsningen af testkemikaliet bør indføres i eksponeringssystemet ved hjælp af en egnet pumpe. Stamopløsningens flowrate bør kalibreres i overensstemmelse med den analytiske bekræftelse af testopløsningerne før påbegyndelse af eksponeringen, og den kontrolleres regelmæssigt via volumenmåling under testen. Testopløsningen i hvert enkelt kammer fornyes med passende mellemrum (f.eks. mindst 5 volumenfornyelser/dag til op til 16 volumenfornyelser/dag eller op til 20 ml/min. flow) afhængigt af testkemikaliet's stabilitet og vandkvaliteten.
15. Testopløsninger med de valgte koncentrationer fremstilles ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsningen bør fortrinsvis fremstilles ved en simpel mekanisk opblanding eller omrystning af testkemikaliet i fortyndingsvandet (f.eks. ved omrøring og/eller ultralydsbehandling). Mætningssøjler/-systemer eller passive doseringsmetoder (14) kan anvendes for at opnå en passende koncentration i stamopløsningen. Det bør tilstræbes at undgå opløsningsmidler eller bærestoffer, fordi: (1) visse opløsningsmidler i sig selv kan føre til toksicitet og/eller uønskede eller uventede reaktioner, (2) test af kemikalier over deres vandopløselighed (som det ofte sker gennem brug af opløsningsmidler) kan resultere i unøjagtige bestemmelser af effektive koncentrationer, (3) brugen af opløsningsmidler i længerevarende test kan resultere i dannelse af en betydelig mængde biofilm som følge af mikrobiel aktivitet, som kan påvirke miljøforholdene og muligheden for at opretholde eksponeringskoncentrationer, og (4) i fravær af historiske data, der viser, at opløsningsmidlet ikke påvirker resultatet af undersøgelsen, kræver brugen af opløsningsmidler en behandling af kontrolkultur med opløsningsmiddel, der har dyrevelfærdsmæssige konsekvenser, da der kræves flere dyr for at udføre testen. Når der er tale om kemikalier, som er vanskelige at teste, kan der anvendes et opløsningsmiddel som sidste udvej, og det beskrives i OECD's Guidance Document 23 on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures (Vejledning om vandtoksicitetstest af vanskelige

stoffer og blandinger) (15), hvordan den bedste metode bestemmes. Valget af opløsningsmiddel afgøres af testkemikaliets kemiske egenskaber og tilgængeligheden af historiske data om brugen af opløsningsmidlet. Hvis der anvendes opløsningsmidler som bærestof, bør passende kontrolkulturer med opløsningsmiddel evalueres i tillæg til (negative) kontrolkulturer uden opløsningsmiddel (kun fortyndingsvand). Hvis brug af et opløsningsmiddel er uundgåelig, og mikrobiologisk aktivitet (biofilmdannelse) forekommer, anbefales det, at biofilmdannelsen i de enkelte tanke registreres/rapporteres (mindst ugentligt) under hele testforløbet. Ideelt bør opløsningsmiddelkoncentrationen holdes konstant i kontrolkulturen med opløsningsmiddel og i alle testbehandlinger. Hvis koncentrationen af opløsningsmidlet ikke holdes konstant, bør den højeste koncentration af opløsningsmidlet i forsøgsbehandlingen anvendes i kontrolkulturen med opløsningsmiddel. I tilfælde hvor der anvendes opløsningsmiddel som bærestof, bør de maksimale opløsningsmiddelkoncentrationer ikke overstige 100 µl/l eller 100 mg/l (15), og det anbefales, at opløsningsmiddelkoncentrationen holdes så lav som muligt (*f.eks.* < 20 µl/l) for at undgå, at opløsningsmidlet påvirker de målte endepunkter (16).

Forsøgsdyr

Valg og hold af fisk

16. Forsøgsarten er japansk risfisk, *Oryzias latipes*, på grund af dens korte livscyklus og muligheden for at fastslå det genetiske køn. Selv om andre små fiskearter kan tilpasses til en tilsvarende forsøgsprotokol, finder de specifikke metoder og observerede endepunkter i denne forsøgsmetode kun anvendelse på japansk risfisk (jf. punkt 1). Japansk risfisk er nem at få til at yngle i fangenskab; der findes publicerede metoder til avl af den (17) (18) (19), og der foreligger data om dødeligheden på kort sigt, forsøg på den tidlige livsstadium og forsøg i den fulde livscyklus (5) (6) (8) (9) (20). Alle fisk udsættes for 16 timers lys og 8 timers mørke. Fiskene fodres med levende saltsøkrebs af arten *Artemia* spp., nauplii, som om nødvendigt kan suppleres med foder i flager, der er kommercielt tilgængeligt. Kommercielt tilgængeligt foder i flager bør regelmæssigt analyseres for forurenende stoffer.
17. Når en passende opdrætspraksis følges, kræves ingen specifik avlsprotokol. For eksempel kan japansk risfisk opdrættes i 2 l beholdere med 240 fiskelarver pr. tank indtil 4 uger efter befrugtning, derefter kan de opdrættes i 2 l beholdere med 10 fisk pr. beholder indtil 8 uger efter befrugtning, hvorefter de overføres til ynglepar i 2 l beholdere.

Akklimatisering og valg af fisk

18. Forsøgsfisk udvælges fra en enkelt laboratoriebestand, som i mindst to uger forud for testen er blevet akklimatiseret under vandkvalitets- og lysbetingelser, som svarer til de i testen anvendte (Bemærk: denne akklimatiseringsperiode er ikke en in situ-

præeksponeringsperiode). Det anbefales, at forsøgsmaskene opnå fra avl i laboratoriet, da forsendelse af voksne fisk er stressende og kan påvirke en pålidelig gydning. Fiskene fodres med saltsøkrebs to gange om dagen i hele perioden og i eksponeringsfasen, om nødvendigt suppleret med kommercielt tilgængeligt foder i flager. Mindst 42 ynglepar (54 ynglepar, hvis der kræves en kontrolkultur med opløsningsmiddel, til dels på grund af manglende historiske data til støtte for brugen af kontrolkulturen med opløsningsmiddel alene) anses for at være nødvendige til opstart af denne test for at opnå en passende replikation. Derudover bør det kontrolleres, at hvert enkelt ynglepar i F0-generationen består af XX-XY (dvs. normal tilstedeværelse af kønskromosomer i hvert køn) for at undgå en mulig medtagelse af spontane XX-hanner (jf. punkt 39).

19. I akklimatiseringsperioden bør dødeligheden i fiskebestanden registreres, og følgende kriterier anvendes efter en 48-timers tilvænningsperiode:

- Dødeligheden er højere end 10 % i bestanden syv dage forud for overførslen til forsøgssystemet: hele fiskegruppen kasseres.
- Dødeligheden er mellem 5 % og 10 % i bestanden syv dage forud for overførslen til forsøgssystemet: akklimatisering i yderligere syv dage ud over akklimatiseringsperioden på to uger. Hvis dødeligheden er over 5 % i den anden syvdagesperiode, kasseres hele fiskegruppen.
- Dødeligheden er på under 5 % i bestanden syv dage forud for overførslen til forsøgssystemet: fiskegruppen godkendes.

20. Fiskene bør ikke behandles for sygdomme i akklimatiseringsperioden på to uger forud for testen og i eksponeringsperioden, og sygdomsbehandling bør helt undgås, hvis det er muligt. Fisk med kliniske sygdomstegn bør ikke anvendes i undersøgelsen. Der bør føres journal over observationer og eventuelle profylaktiske eller terapeutiske sygdomsbehandlinger i perioden forud for testen.

21. Eksponeringen indledes med seksuelt dimorfe voksne fisk fra en laboratoriepopulation af kønsmodne dyr ved 25 ± 2 °C. Fiskene bør identificeres som aktivt gydende (dvs. at de har produceret levedygtige unger) i ugen forud for eksponeringen. For hele fiskegruppen, der bruges i testen, gælder det, at området for han- og hunfisks individuelle vægt ved testens begyndelse om muligt bør holdes inden for ± 20 % af den aritmetiske gennemsnitsvægt for det relevante køn. Et deludsnit af fiskene bør vejes forud for testen for at anslå gennemsnitsvægten. Fiskene bør udvælges mindst 12 uger efter befrugtning og bør veje ≥ 300 mg for hunner og ≥ 250 mg for hanner.

TESTDESIGN

Testkoncentrationer

22. Det anbefales, at der anvendes fem koncentrationer af kemikaliet plus kontrol(ler). Alle informationskilder bør tages i betragtning ved bestemmelse af rækken af testkoncentrationer, herunder Quantitative Structure Activity Relationship (kvantitativ relation mellem struktur og aktivitet, QSAR), analogislutning, resultater af fisketest såsom assays for akut toksicitet for fisk (kapitel C.1 i dette bilag), fish short-term reproduction assay (assay for fisks reproduktion på kort sigt) (kapitel C.48 i dette bilag) og andre forsøgsmetoder, f.eks. kapitel C.15, C.37, C.41, C.47 eller C.49 i dette bilag (21) (22) (23) (24) (25) (26), hvis de foreligger, eller om nødvendigt fra en test til bestemmelse af dosisinterval, der muligvis omfatter en reproduktionsfase. Om nødvendigt kan testen til bestemmelse af dosisinterval gennemføres under forhold (vandkvalitet, testsystem, antal dyr pr. beholder), der svarer til dem, der anvendes i den endelige test. Hvis det er nødvendigt at anvende et opløsningsmiddel, og der ikke findes nogen historiske data, kan testen til bestemmelse af dosisinterval anvendes til at identificere opløsningsmidlets egnethed. Den højeste testkoncentration bør ikke overstige vandopløseligheden, 10 mg/l eller 1/10 af 96h-LC50 (27). Den laveste koncentration bør være 10 til 100 gange lavere end den højeste koncentration. Anvendelse af fem koncentrationer i denne test gør det muligt ikke blot at måle dosis/respons-forhold, men også den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) og en NOEC, som er nødvendige i forbindelse med risikovurderingen i nogle lovmæssige programmer eller jurisdiktioner. Generelt er afstandsfaktoren mellem nominelle koncentrationer af testkemikaliet mellem tilgrænsende behandlingsniveauer $\leq 3,2$.

Replikater inden for behandlingsgrupper og kontroller

23. Der bør anvendes mindst seks replikattestkamre pr. testkoncentration (jf. tillæg 7). I reproduktionsfasen (dog ikke F0-generationen) fordobles replikationsstrukturen i forbindelse med frugtbarhedsvurderingen, og hvert enkelt replikat består kun af ét ynglepar (jf. punkt 42).
24. Der bør gennemføres en kontrolkultur med fortyndingsvand, og om nødvendigt bør der gennemføres en kontrolkultur med opløsningsmiddel ud over testkoncentrationerne. Der bør anvendes det dobbelte antal replikatkamre til kontroller for at sikre en tilstrækkelig statistisk signifikans (dvs. at der skal anvendes mindst 12 replikater til kontrol). I reproduktionsfasen fordobles antallet af replikater i kontrollerne (dvs. at der som minimum skal være 24 replikater, og hvert enkelt replikat består kun af et ynglepar). Efter reproduktion bør kontrolreplikaterne ikke indeholde mere end 20 embryoner (fisk).

FREMGANGSMÅDE

Indledning af testen

25. De ynglende voksne fisk, der anvendes til at starte testens F0-generation, udvælges på grundlag af to kriterier: alder (typisk over 12 uger efter befrugtning, men det anbefales, at de ikke er ældre end 16 uger efter befrugtning) og vægt (bør være ≥ 300 mg for hunner og ≥ 250 mg for hanner).
26. Hun-han-par, der opfylder ovenstående specifikationer, flyttes som individuelle par til hvert enkelt replikat, dvs. 12 replikater i kontrolgruppen og seks replikater, der udsættes for kemisk behandling, ved testens start. Disse tanke tildeles vilkårligt en behandling (f.eks. T1-T5 og kontrol) og et replikat (f.eks. A-L i kontroller og A-F i behandling) og anbringes i eksponeringssystemet med et passende flow i hver enkelt beholder.

Eksponeringsbetingelser

27. Et fuldstændigt sammendrag af testparametre og -betingelser findes i tillæg 3. Overholdelse af disse specifikationer bør resultere i kontrolfisk med endepunktsværdier svarende til dem, der er oplistet i tillæg 4.
28. Under testen måles opløst ilt, pH og temperatur i mindst en testbeholder i hver behandlingsgruppe og kontrollen. Disse målinger, bortset fra temperaturmålingerne, udføres som minimum en gang om ugen i hele eksponeringsperioden. Den gennemsnitlige vandtemperatur skal ligge på mellem 24 og 26 °C under hele testen. Temperaturen måles hver dag i hele eksponeringsperioden. Vandets pH skal ligge i intervallet 6,5-8,5, men bør i løbet af en given test ligge inden for et interval på $\pm 0,5$ pH-enheder. Replikater inden for en behandling bør ikke være statistisk forskellige fra hinanden, og behandlingsgrupperne i testen bør ikke være statistisk forskellige fra hinanden (baseret på daglige temperaturmålinger, idet der ses bort fra kortvarige afvigelser).

Eksponeringens varighed

29. I testen eksponeres seksuelt aktive fisk fra F0 i tre uger. I uge 4 på omkring testdag 24 bestemmes F1, og F0-yngleparrene aflives humanitært, og deres vægt og længde registreres (jf. punkt 34). Derefter eksponeres F1-generationen i yderligere 14 uger (i alt 15 uger for F1), og F2-generationen i to uger indtil klækning. Testen løber over i alt 19 uger (dvs. indtil F2 er klækket). Tidslinjerne for testen fremgår af tabel 2 og forklares i detaljer i tillæg 9.

Fodring

30. Fiskene kan fodres med levende saltsøkrebs af arten *Artemia* spp. (24 timer gamle nauplii) *ad libitum*, om nødvendigt suppleret med foder i flager, der er kommercielt tilgængeligt. Kommercielt tilgængeligt foder i flager bør regelmæssigt analyseres for tilstedeværelse af forurenende stoffer som chlorholdige organiske pesticider, polycykliske aromatiske kulbrinter (PAH) og polychlorerede biphenyler (PCB). Foder med et højt niveau af hormonforstyrrende stoffer (fytøstrogener), som ville kompromittere testens respons, bør

undgås. Uspiste foderrester og fækal materiale bør fjernes fra testbeholderne efter behov, f.eks. ved omhyggeligt at rense bunden af hver beholder ved hjælp af en siphon. De enkelte beholderes sider og bund bør også rengøres en eller to gange om ugen (f.eks. ved at skrabe med en spatel). Et eksempel på en fodringsplan findes i tillæg 5. Fodringen baseres på antallet af fisk pr. replikat. Fodringen nedsættes derfor, hvis der forekommer dødsfald i replikatet.

Analytiske bestemmelser og målinger

31. Inden eksponeringsperioden påbegyndes, kontrolleres det, at kemikaliertilførselssystemet fungerer korrekt. Alle de nødvendige analysemetoder bør være fastlagt, herunder tilstrækkeligt kendskab til kemikaliets stabilitet i testsystemet. Under testen bestemmes koncentrationerne af testkemikaliets med passende intervaller, helst mindst en gang om ugen i et replikat i hver behandlingsgruppe, idet der skiftes mellem replikaterne inden for den samme behandlingsgruppe hver uge.
32. Under testen kontrolleres flowraterne for fortyndingsmidlet og stamopløsningen med passende intervaller (f.eks. mindst tre gange om ugen). Det anbefales, at resultaterne baseres på målte koncentrationer. Hvis testkemikaliets koncentration i tilstrækkelig grad har holdt sig inden for $\pm 20\%$ af de målte gennemsnitsværdier gennem hele testen, kan resultaterne baseres på enten de nominelle eller de målte værdier. Såfremt kemikalierne ophobes markant i fiskene, kan testkoncentrationerne mindskes, efterhånden som fiskene vokser. I sådanne tilfælde anbefales det, at fornyelseshastigheden af testopløsningen i hvert enkelt kammer tilpasses med henblik på at holde testkoncentrationerne så stabile som muligt.

Observationer og målte endepunkter

33. De målte endepunkter omfatter frugtbarhed, fertilitet, klækning, vækst og overlevelse med henblik på evaluering af mulige effekter på populationen. Der bør også dagligt foretages observationer af adfærd, og usædvanlig adfærd noteres. Andre mekanistiske endepunkter omfatter hepatisk *vtg* mRNA eller VTG-proteinniveauer i et immunoassay (28), fænotypiske kønsmarkører som karakteristiske papillære strukturer på gatfinnen hos hanner, evaluering af køn baseret på væv fra kønskirtler og histopatologisk evaluering af nyrer, lever og kønskirtler (jf. listen over endepunkter i tabel 1). Alle disse specifikke endepunkter evalueres i forbindelse med bestemmelse af individets genetiske køn baseret på tilstedeværelsen eller fraværet af det gen, der bestemmer hankøn hos japansk risfisk, *dmy* (jf. punkt 41). Derudover vurderes den tid, der går inden gydning. Endvidere kan simple fænotypiske kønsfordelinger udledes ved hjælp af information fra tællinger af papillære strukturer på gatfinnen med henblik på bestemmelse af de individuelle japanske risfisk som fænotypiske hanner eller hunner. Denne forsøgsmetode forventes ikke at påvise beskedne afvigelser fra det forventede forhold mellem kønnene, fordi det relativt lille antal

fisk pr. replikat ikke vil være tilstrækkeligt statistisk signifikant. Under den histopatologiske bedømmelse evalueres kønskirtlen, og der foretages langt mere indgående analyser med henblik på bestemmelse af kønskirtelfænotypen i forbindelse med det genetiske køn.

34. Det primære formål med denne forsøgsmetode er at vurdere testkemikaliets potentielle populationsrelevante effekter. Mekanistiske endepunkter (VTG, SSC'er og visse histopatologiske effekter på kønskirtlerne) kan også bidrage til en klarlæggelse af, om eventuelle effekter medieres via endokrin aktivitet. Disse mekanistiske endepunkter kan dog også påvirkes af systemisk toksicitet og andre former for toksicitet. Derfor kan lever- og nyrehistopatologi også vurderes indgående for at bidrage til en bedre forståelse af eventuelle responser i mekanistiske endepunkter. Hvis sådanne detaljerede evalueringer ikke udføres, bør iøjnefaldende abnormiteter, der observeres tilfældigt under den histopatologiske evaluering, dog fortsat noteres og rapporteres.

Human aflivning af fisk

35. Ved afslutningen af eksponeringen af F0- og F1-generationerne, hvor der udtages delprøver af næsten fuldvoksne fisk, aflives fiskene med passende mængder bedøvelsesmiddel (f.eks. tricainmethansulfonat, MS-222 (CAS.886-86-2), 100-500 mg/l), bufret med 300 mg/l NaHCO_3 (natriumbicarbonat, CAS 144-55-8) for at reducere irritation af slimhinderne. Hvis fiskene viser tegn på, at de lider meget (virkelig meget, og det med pålidelighed kan forudsiges, at de vil dø) og betragtes som døende, bør de bedøves og aflives og behandles som dødelighed i forbindelse med dataanalysen. Når en fisk aflives på grund af dødelighed, skal det noteres og rapporteres. Afhængigt af, hvornår fiskene aflives i løbet af undersøgelsen, kan de opbevares med henblik på histopatologiske analyser (fiksering af fiskene med henblik på eventuel histopatologi).

Håndtering af æg og larver

Indsamling af æg fra yngleparrene med henblik på opformering af den næste generation

36. Indsamlingen af æg foregår den første dag (eller de første to dage, hvis det er nødvendigt) af testuge 4 for at gå fra F0 til F1 og testuge 18 for at gå fra F1 til F2. Testuge 18 svarer til F1, voksne fisk 15 uger efter befrugtning. Det er vigtigt, at alle æggene fjernes fra de enkelte tanke dagen før, indsamlingen af æg påbegyndes, for at sikre at alle de æg, der indsamles fra et ynglepar, stammer fra en enkelt gydning. Efter gydningen bærer hunnen hos japansk risfisk undertiden æggene i nærheden af gattet, indtil de kan anbringes på et substrat. Da der ikke findes noget substrat i beholderen, kan æggene findes enten hæftet på hunnen eller i bunden af beholderen. Afhængigt af deres placering fjernes æggene forsigtigt fra hunnen eller suges op fra bunden i testuge 4 for F0 og testuge 18 for F1. Alle de æg, der indsamles i en behandling, samles, inden de fordeles i inkubationskamre.

37. Ægfilamentene, der holder de gydede æg sammen, bør fjernes. Befrugtede æg (op til 20) indsamles fra hvert ynglepar (1 par pr. replikat), samles for hver behandling og fordeles systematisk i passende inkubationskamre (tillæg 6, 7). Ved hjælp af et dissektionsmikroskop af god kvalitet kan de karakteristiske tegn på tidlig befrugtning/udvikling som f.eks. fortykkelse af fertiliseringsmembranen (chorion), igangværende celledeling eller udvikling af blastula ses. Inkubationskamrene kan anbringes i separate "inkubationsakvarier", der er sat op til hver enkelt behandling (i dette tilfælde skal parametrene for vandkvalitet og koncentrationerne af testkemikalier i disse akvarier måles), eller i replikatakvariet, i hvilket de klækkede larver (*f.eks.* eleutheroembryon) vil blive opbevaret. Hvis der er behov for en anden indsamlingsdag (testdag 23), bør alle æggene fra begge dage samles og derefter systematisk omfordeles i hvert af behandlingsreplikaterne.

Pasning af æg indtil klækning

38. De befrugtede æg bevæges konstant, *f.eks.* i æginkubatoren ved hjælp af luftbobler eller ved at æginkubatoren svinges vertikalt. Dødeligheden af befrugtede æg (embryoner) kontrolleres og registreres dagligt. Døde æg fjernes fra inkubatorerne (tillæg 9). På den 7. dag efter befrugtningen (dpf) standses eller reduceres bevægelsen, så de befrugtede æg lægger sig på bunden af inkubatoren. Dette fremmer klækning typisk i løbet af de næste 1-2 dage. For hver behandling og kontrol tælles fiskeynglen (unge larver, eleutheroembryon) (samlet replikat). Befrugtede æg, der ikke er klækket inden for to gange mediandagen for klækning i kontrollen (typisk 16 eller 18 dpf), betragtes som ikke-levedygtige og kasseres.
39. 12 individer af fiskeynglen overføres til hver replikatbeholder. Fiskeynglen fra inkubationskamrene samles og fordeles systematisk i replikatbeholderne (tillæg 7). Dette kan ske ved vilkårlig udvælgelse af et individ af fiskeynglen fra behandlingsgruppen, hvorefter der successivt tilfældigt udvælges et individ, som overføres til et replikatakvarium. Hver beholder skal indeholde et lige antal ($n=12$) af de klækkede larver (maksimalt 20 larver i hver). Hvis der ikke er nok fiskeyngel til at fylde behandlingsreplikaterne, anbefales det, at det sikres, at så mange replikater som muligt har 12 individer. Fiskeynglen kan håndteres sikkert med glaspipetter med stor huldiameter. Eventuel overskydende fiskeyngel aflives humanitært med bedøvelsesmiddel. I de få uger forud for sammensætningen af ynglepar, registreres den dag, hvor den første gydning observeres i hvert enkelt replikat.

Sammensætning af ynglepar

Klipning af finnerne og bestemmelse af det genotypiske køn

40. Bestemmelse af det genotypiske køn ved hjælp af finneklipning foregår 9-10 uger efter befrugtning (dvs. testuge 12-13 for F1-generationen). Alle fisk i en tank bedøves (ved

hjælp af godkendte metoder, f.eks. IACUC), og en lille vævsprøve udtages enten fra rygfinnen eller den ventrale spids på halefinnen på hver fisk med henblik på bestemmelse af individets genotypiske køn (29). Fiskene fra et replikat kan anbringes i små bure, om muligt én pr. bur, i replikatbeholderen. Alternativt kan to fisk anbringes i hvert bur, hvis de kan skelnes fra hinanden. En metode går ud på til at variere klipning af halefinnen (*f.eks.* den dorsale spids i modsætning til den ventrale spids), når vævsprøven udtages.

41. Japansk risfisks genotypiske køn bestemmes ved hjælp af et identificeret og sekvenseret gen (*dmy*), som befinder sig på Y-kromosomet. Tilstedeværelsen af *dmy* viser et XY-(han)individ uanset fænotype, mens fraværet af *dmy* viser et XX-(hun)individ uanset fænotype (30). (31). Deoxyribonukleinsyre (DNA) fra hvert finneklipe ekstraheres, og tilstedeværelsen eller fraværet af *dmy* kan bestemmes ved hjælp af en polymerasekædereaktion (PCR) (jf. tillæg 9 i kapitel C.41 i dette bilag, eller tillæg 3 og 4 i (29).

Etablering af ynglepar

42. Information om det genotypiske køn anvendes til at etablere XX-XY-ynnglepar uanset ekstern fænotype, som kan ændres ved eksponering for testkemikaliet. Dagen efter genotypebestemmelsen af hver enkelt fisk, udvælges der tilfældigt to XX-fisk og to XY-fisk fra hvert replikat, og der etableres to XX-X-ynnglepar. Hvis et replikat ikke har enten to XX- eller to XY-fisk, bør der hentes fisk fra andre replikater inden for behandlingen. Det bør prioriteres, at der er det anbefalede antal replikatynnglepar (12) i hver behandling og i kontrollerne (24). Fisk med synlige abnormiteter (svømmeblæreproblemer, rygøjlemisdannelser, ekstreme størrelsesvariationer osv.) udelukkes ved etableringen af ynglepar. I reproduktionsfasen for F1 bør hver replikatbeholder kun indeholde et ynglepar.

Udtagelse af prøver af unge individer og endepunktsvurdering

Udtagelse af prøver af fisk, der ikke indgår i ynglepar

43. Efter sammensætningen af ynglepar aflives de fisk, der ikke udvælges til videreavl, humant med henblik på måling af endepunkterne for næsten fuldvoksne individer i testuge 12-13 (F1). Det er meget vigtigt, at fiskene håndteres på en sådan måde, at bestemmelsen af genotypisk køn med henblik på etablering af ynglepar fortsat kan spores til den enkelte fisk. Alle de data, der indsamles, analyseres i forhold til den specifikke fisks genotypiske køn. Hver enkelt fisk anvendes til en række endepunktsmålinger, herunder: bestemmelse af overlevelsesrater for ungfish/næsten fuldvoksne individer (testuge 7-12/13 (F1)), vækst i længde (standardlængden kan måles, hvis halefinnen er blevet afkortet på grund af udtagelse af prøven til bestemmelse af det genetiske køn). Den samlede længde kan måles, hvis blot en del af halefinnen (dorsal eller ventral) er udtaget til bestemmelse af *dmy*), og kropsvægt (dvs. vådvægt, vægt, når den er duppet tør), lever *vtg* mRNA (eller VTG) og

papillære strukturer på gatfinnen (jf. tabel 1 og 2). Bemærk, at yngleparrenes vægt og længde også skal bruges ved beregning af den gennemsnitlige vækst i en behandlingsgruppe.

Vævsprøvetagning og vitellogeninmåling

44. Leveren dissekteres og opbevares ved $\leq -70^{\circ}\text{C}$, indtil *vtg* mRNA (eller VTG) målingerne foretages. Fiskens hale, herunder gatfinnen, præpareres i et passende fiksativ (f.eks. Davidson's) eller fotograferes, så papillære strukturer på gatfinnen kan tælles på et senere tidspunkt. Hvis det ønskes, kan der samtidig udtages og præpareres andre vævsprøver (dvs. af kønskirtlerne). Lever-VTG-koncentrationen måles ved hjælp af en homolog ELISA-teknik (jf. de anbefalede procedurer for japansk risfisk i tillæg 6 i kapitel C.48 i dette bilag). Alternativt er metoderne til måling af *vtg* mRNA, dvs. *vtg I* gen mRNA-ekstraktion fra en leverprøve og måling af antallet af kopier af *vtg I* genet (pr. ng af samlet mRNA) ved hjælp af kvantitativ PCR blevet fastlagt af U.S EPA (29). I stedet for at bestemme antallet af kopier af *vtg* genet i kontrol- og behandlingsgrupper består en mere ressourcevenlig og mindre teknisk vanskelig metode i at bestemme den relative (fold-)ændring i *vtg I*-ekspressionen i kontrol- og behandlingsgrupperne.

Sekundære kønskarakteristika

45. Under normale omstændigheder har kun kønsmodne hanner af japansk risfisk papillære strukturer, som udvikles på nogle af finnestrålernes ledskiver som sekundære kønskarakteristika, der kan fungere som potentiel biomarkør for hormonforstyrrende virkninger. Metoden til tælling af papillære strukturer på gatfinnen (antal ledskiver med papillære strukturer) findes i tillæg 8. Antallet af papillære strukturer på gatfinnen anvendes ligeledes til at kategorisere det pågældende individ som eksternt fænotypisk han eller hun med henblik på beregningen af et enkelt forhold mellem kønnene pr. replikat. En japansk risfisk med mere end 0 papillære strukturer på gatfinnen defineres som en han; en japansk risfisk med 0 papillære strukturer på gatfinnen defineres som en hun.

Vurdering af frugtbarhed og fertilitet

46. Frugtbarhed og fertilitet bedømmes i testuge 1-3 i F0-generationen og i testuge 15-17 i F1-generationen. Æg indsamles dagligt fra hvert ynglepar i 21 på hinanden følgende dage. Æggene fjernes forsigtigt fra hunner fanget i net og/eller opsuges fra bunden af akvariet hver morgen. Både frugtbarhed og fertilitet registreres dagligt for hvert ynglepar i replikaterne. Frugtbarhed defineres som antallet af gydede æg, og fertiliteten defineres funktionelt som antallet af befrugtede og levedygtige æg på tidspunktet for tællingen. Tællingen bør ske hurtigst muligt efter indsamlingen af æggene.
47. Replikatfrugtbarheden registreres dagligt som antal æg pr. ynglepar, der analyseres ved hjælp af de anbefalede statistiske procedurer og gennemsnitsværdierne for replikatet.

Replikatets fertilitet er summen af antallet af befrugtede æg, som et ynglepar har produceret, divideret med antallet af æg, som dette par har gydet. I statistisk henseende analyseres fertiliteten som et forhold pr. replikat. Klækningsevnen i replikatet er antallet af fiskeyngelindivider divideret med antallet af tilførte embryoner (typisk 20). I statistisk henseende analyseres klækningsevnen som et forhold pr. replikat.

Prøveudtagning af voksne og endepunktsvurdering

Prøveudtagning af ynglepar

48. Efter testuge 17 (dvs. når F2-generationen er startet godt) aflives de voksne i F1-generationen humant, og forskellige endepunkter vurderes (jf. tabel 1 og 2). Gatfinnen fotograferes med henblik på vurdering af papillære strukturer på gatfinnen (jf. tillæg 8), og/eller halen lige efter gattet fjernes og fikseres med henblik på en senere tælling af papillære strukturer. En del af halefinnen kan udtages til prøve og arkiveres på dette tidspunkt med henblik på verifikation af genetisk køn (*dmy*), hvis det ønskes. Om nødvendigt kan der udtages en vævsprøve for at gentage *dmy*-analysen med henblik på at verificere specifikke fisks genetiske køn. Bughulen åbnes for at tillade perfusion med passende fikseringsmiddel (f.eks. Davidson's), inden hele kroppen nedsænkes i fikseringsmidlet. Foretages der et passende permealiseringstrin forud for fikseringen, er det imidlertid ikke nødvendigt at åbne bughulen.

Histopatologi

49. Hver enkelt fisk undersøges histologisk for sygdomme i kønskirtelvævet (30); (29). Som anført i punkt 33 kan andre endepunkter, der vurderes i dette assay (dvs. VTG, SSC'er og visse histopatologiske effekter på kønskirtlerne), påvirkes af systemisk toksicitet og andre former for toksicitet. Derfor kan lever- og nyrehistopatologi også vurderes indgående for at bidrage til en bedre forståelse af eventuelle responser i mekanistiske endepunkter. Hvis sådanne detaljerede evalueringer ikke udføres, bør iøjnefaldende abnormiteter, der observeres tilfældigt under den histopatologiske evaluering, dog fortsat noteres og rapporteres. "Analogislutninger" fra den højeste behandlingsgruppe (sammenlignet med kontrollen) til en behandling uden nogen virkning kan overvejes, men det anbefales dog, at vejledningen om histopatologi læses (29). Typisk behandles alle prøverne, og/eller der laves tyndsnit, hvorefter de fortolkes af en patolog. Hvis der anvendes en tilgang med "analogislutninger", bemærkes det, at Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS)-proceduren anvender forventningen om, at når dosis forhøjes, øges de biologiske effekter (patologien) også. Derfor vil man miste effekt, hvis man kun ser på en enkelt høj dosis uden at se på nogen mellemhøje doser. Hvis den statistiske analyse ikke er nødvendig for at bestemme, at den høje dosis ikke har nogen virkning, kan denne tilgang accepteres. Fænotypen i kønskirtlerne bedømmes også ved denne vurdering.

Andre observationer

50. MEOGRT resulterer i data, der kan anvendes (f.eks. i en weight of evidence-analyse) til samtidigt at vurdere mindst to generelle typer af adverse outcome pathways (AOP'er), der ender i forringet reproduktion: (a) endokrinmedierede toksicitetsveje, der indebærer forstyrrelser af hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG)-endokrinaksen; og (b) toksicitetsveje, der forårsager nedsat overlevelse, vækst (længde og vægt) og reproduktion via ikke-endokrinmedieret toksicitet. De endepunkter, der typisk måles i kroniske toksicitetstest såsom fuld livscyklus-testen og test i det tidlige livsstadium, indgår i denne test og kan anvendes til at vurdere de farer, som udgøres af såvel ikke-endokrinmedierede toksiske virkemåder og endokrinmedierede toksicitetsveje. Under testen foretages der dagligt observationer af adfærd, og usædvanlig adfærd noteres. Derudover registreres eventuel dødelighed og overlevelse frem til udvælgelsen (testuge 6/7), overlevelse efter udvælgelse af prøver af næsten fuldvoksne individer (9-10 uger efter befrugtning), og overlevelsen fra etablering af par til udtagelsen af prøver af fuldvoksne fisk beregnes.

Tabel 1: Endepunktsoversigt for MEOGRT*

Livsstadium	Endepunkt	Generation
Embryoner (2 uger efter befrugtning)	Klækning (% og tidspunkt for klækning)	F1, F2
Ung (4 uger efter befrugtning)	Overlevelse	F1
Næsten fuldvoksen (9 eller 10 uger efter befrugtning)	Overlevelse	F1
	Vækst (længde og vægt)	
	Vitellogenin (mRNA eller protein)	
	Sekundære kønskaraktistika (papillære strukturer på gatfinnen)	
	Eksternt forhold mellem kønnene	
	Tid til 1. gydning	
Fuldvoksen (12-14 uger efter befrugtning)	Reproduktion (frugtbarhed og fertilitet)	F0, F1
Fuldvoksen	Overlevelse	F1

(15 uger efter befrugtning)	Vækst (længde og vægt)	
	Sekundære kønskarakteristika (papillære strukturer på gatfinnen)	
	Histopatologi (kønskirtel, lever, nyre)	

*Disse endepunkter analyseres statistisk

TIDSPLAN

51. En tidslinje for MEOGRT illustreret i tabel 2 viser testen. MEOGRT omfatter 4 uger med eksponering af F0-voksne og 15 uger med eksponering af F1-generationen, og eksponeringsperioden for den anden generation (F2) indtil klækning (2 uger efter befrugtning). Aktiviteten i løbet af MEOGRT er sammenfattet i tillæg 9.

Tabel 2: Eksponering og måling af endepunktstidslinjer for MEOGRT.

MEOGRT eksponerings- og endepunktstidsplan																								
F0	1	2	3	4																				
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15						
F2																		1	2					
Testuge	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19					
Nøgle til livsstadium					Embryoner					Larve					Ung					Næsten fuldvoksen		Fuldvoksen		
Endepunkter																								
Frugtbarhed	F ₀														F ₁					• Testdesignet har 7 grupper af replikater ○ 5 til behandling med testkemikalie ○ 2 til kontrolbehandling (4, hvis der anvendes et opløsningsmiddel) • Design inden for gruppen ○ 12 replikater til reproduktion, voksenpatologi og SSC (uge 10-18) ○ 6 replikater til klækning, overlevelse, Vtg; og - SSC for næsten fuldvoksne individer og vækst (uge 1-9) SSC: sekundære kønskarakteristika Vtg: vitellogenin				
Fertilitet	F ₀														F ₁									
Klækning					F ₁														F ₂					
Overlevelse						F ₁							F ₁						F ₁					
Vækst					F ₀								F ₁						F ₁					
Vitellogenin													F ₁											
Sekundære kønskarakteristika													F ₁						F ₁					
Histopatologi																			F ₁					
Testuge	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19					

DATARAPPORTERING

Statistisk analyse

52. Da det genotypiske køn bestemmes for alle fiskene, bør dataene analyseres separat for hvert genotypisk køn (dvs. XY-hanner og XX-hunner). Sker dette ikke, vil det i høj grad reducere den statistiske signifikans af enhver analyse. Statistiske dataanalyser skal helst følge de procedurer, der er beskrevet i OECD's Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application (32). Tillæg 10 indeholder yderligere vejledning om statistiske analyser.

53. Testdesignet og valget af statistisk test bør give tilstrækkelig styrke til at påvise ændringer af biologisk betydning i endepunkter, hvor der skal registreres en NOEC-værdi (32). Rapporteringen af relevante effektkoncentrationer og parametre kan afhænge af de lovmæssige rammer. Den procentvise ændring i hvert af de endepunkter, som det er vigtigt at undersøge eller vurdere, bør påvises. Testdesignet bør tilpasses til dette formål. Det er ikke sandsynligt, at den samme procentvise ændring gælder for alle endepunkter, og det er heller ikke sandsynligt, at der kan designes et forsøg, som opfylder disse kriterier for alle

endepunkter, og man bør derfor i forbindelse med testdesignet fokusere på de endepunkter, der er vigtige for de respektive forsøg. Et statistisk flowdiagram og retningslinjer findes i tillæg 10 som hjælp til databehandlingen og valget af den mest egnede statistiske test eller model. Andre statistiske metoder kan anvendes, forudsat at de er videnskabeligt begrundede.

54. Det er, for at beregne variationen inden for hvert sæt af replikater, nødvendigt at bruge variansanalyse eller kontingenstabelforcedurer, og der bør anvendes tilstrækkelige og passende statistiske metoder på grundlag af denne analyse. Med henblik på at foretage mange sammenligninger af resultaterne ved de enkelte koncentrationer og af kontrollerne, anbefales den nedadgående procedure (f.eks. Jonckheere-Terpstra test) til kontinuerlige responser. Når dataene ikke er overensstemmende med en monoton koncentration/respons, bør Dunnetts test eller Dunns test anvendes (om nødvendigt efter en passende datatransformation).
55. I forbindelse med frugtbarhed foretages ægtællingen dagligt, men den kan analyseres som det samlede antal æg eller som en gentagen foranstaltning. Tillæg 10 indeholder nærmere oplysninger om, hvordan dette endepunkt analyseres. I forbindelse med histopatologiske data, der antager form af alvorsgrad, er der blevet udviklet en ny statistisk test, Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) (33).
56. Eventuelle endepunkter, der observeres i kemiske behandlinger, og som afviger betydeligt fra den tilknyttede kontrol, skal rapporteres.

Dataanalyseovervejelser

Brug af kompromitterede behandlingsniveauer

57. Der skal tages hensyn til flere faktorer, når det bestemmes, om et replikat eller en hel behandling påviser åbenlys toksicitet og skal fjernes fra analysen. Åbenlys toksicitet defineres som >4 dødsfald i et replikat mellem 3 uger efter befrugtning og 9 uger efter befrugtning, som ikke kan forklares ved en teknisk fejl. Andre tegn på åbenlys toksicitet omfatter blødning, abnorm adfærd, abnorme svømmemønstre, anoreksi og andre kliniske sygdomstegn. For subletale tegn på toksicitet kan kvalitative vurderinger være nødvendige og bør altid foretages i forhold til gruppen af kontrolkulturer med fortyndingsvand (kun rent vand). Hvis åbenlys toksicitet forekommer ved de højeste behandlinger, anbefales det, at disse dosisbehandlinger udgår af analysen.

Kontrolkulturer med opløsningsmiddel

58. Opløsningsmidler bør kun bruges som en sidste udvej, når alle andre muligheder for kemikaliertilførsel er blevet overvejet. Hvis der bruges et opløsningsmiddel, bør der

samtidig gennemføres en kontrolkultur med fortyndingsvand. Ved afslutning af testen foretages der en evaluering af opløsningsmidlets potentielle virkninger. Dette sker ved en statistisk sammenligning af gruppen af kontrolkulturer med opløsningsmiddel og gruppen af kontrolkulturer med fortyndingsvand. De mest relevante endepunkter, der skal tages i betragtning i forbindelse med denne analyse, er vækstdeterminanterne (vægt), da disse kan påvirkes af en generel toksicitet. Hvis der påvises statistisk signifikante forskelle i disse endepunkter mellem gruppen af kontrolkulturer med fortyndingsvand og gruppen af kontrolkulturer med opløsningsmiddel, bør den bedste faglige vurdering anvendes til at bestemme, om gyldigheden af testen er kompromitteret. Hvis de to kontroller afviger fra hinanden, bør de behandlinger, der er eksponeret for kemikaliet, sammenlignes med gruppen af kontrolkulturer med opløsningsmiddel, medmindre det er velkendt, at sammenligning med gruppen af kontrolkulturer med fortyndingsvand foretrækkes. Hvis der ikke findes nogen statistisk signifikant forskel mellem de to grupper af kontrolkulturer, anbefales det, at de behandlinger, der er eksponeret for testkemikaliet, sammenlignes med de samlede grupper (grupperne af kontrolkulturer med opløsningsmiddel og fortyndingsvand), medmindre det er velkendt, at sammenligning med enten gruppen af kontrolkulturer med fortyndingsvand eller gruppen af kontrolkulturer med opløsningsmiddel foretrækkes.

Testrapport

59. Testrapporten skal indeholde følgende:

Testkemikalie: fysisk form og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber

- Kemisk identifikation.

Stof med kun én bestanddel:

- fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber
- kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt, osv. (herunder evt. organisk kulstofindhold).

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

- så vidt muligt kendetegnet ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Testarter:

- Videnskabeligt navn, stamme, hvis oplysninger herom foreligger, kilde og metode til indsamling af befrugtede æg og den efterfølgende håndtering af dem.

Testbetingelser:

- Lysperiode(r)
- Testdesign (f.eks. testkamrenes størrelse, materiale og vandmængde, antal testkamre og replikater, antal fiskeyngelindivider pr. replikat)
- Fremstillingsmetode til stamopløsning og hyppighed af udskiftning (hvis der er anvendt opløsningsmiddel, bør dets koncentration anføres)
- Metode til dosering af testkemikaliets (f.eks. pumper, fortyndingssystemer)
- Metodens genfindingsgrad og de nominelle testkoncentrationer, grænsen for kvantitativ bestemmelse, gennemsnittet af de målte værdier og deres standardafvigelser i testbeholderne og den metode, hvorved de er opnået, samt dokumentation for, at målingerne refererer til testkemikaliets faktiske koncentration i en egentlig opløsning
- Fortyndingsvandets karakteristika: pH, hårdhedsgrad, temperatur, koncentration af opløst ilt, restchlorniveau (hvis målt), total organisk kulstof (hvis målt), opslæmmede substanser (hvis målt), saltindhold i testmediet (hvis målt) og alle andre målinger, der er foretaget
- de nominelle testkoncentrationer, de målte middelværdier og deres standardafvigelser
- vandkvalitet i testbeholderne, pH, temperatur (dagligt) og koncentration af opløst ilt
- detaljerede oplysninger om fodring (f.eks. fodertype, -kilde, -mængde og fodringshyppighed).

Resultater:

- bevis for, at kontrollerne opfyldte de generelle validitetskriterier for overlevelse
- data for kontrolgruppen (og kontrolkulturen med opløsningsmiddel, når en sådan anvendes) og behandlingsgrupperne som følger: klækning (klækningsevne og tidspunkt for klækning) for F1 og F2, overlevelse efter klækning for F1, vækst (længde og kropsvægt) for F1, genotypisk køn og kønsdifferentiering (f.eks. sekundære kønskarakteristika baseret på papillære strukturer på gatfinnen og kønskirtelhistologi) for F1, fænotypisk køn for F1, sekundære kønskarakteristika (papillære strukturer på gatfinnen) for F1, *vtg* mRNA (eller VTG protein) for F1, histopatologisk vurdering (kønskirtel, lever og nyre) for F1 og reproduktion (frugtbarhed og fertilitet) for F0, F1 (jf. tabel 1 og 2)
- statistisk analysemetode (regressionsanalyse eller variansanalyse) og behandling af data (anvendte statistiske test og modeller)
- koncentration uden observeret effekt (NOEC) ved hver måling

- laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) ved hver måling (ved $p = 0,05$). EC_x for hver måling, hvis det er relevant, og konfidensintervaller (f.eks. 90 % eller 95 %) og en graf med den fittede model, der blev brugt til beregningen, koncentrationsresponskurvens hældning, regressionsmodellens formel, de estimerede modelparametre og deres standardafvigelse
- eventuelle afvigelser fra denne forsøgsmetode og afvigelser fra acceptkriterierne og overvejelser af de potentielle konsekvenser for resultaterne af testen.

60. I forbindelse med resultaterne af endepunktsmålingerne bør gennemsnitsværdierne og deres standardafvigelser (om muligt for såvel replikat som koncentration) præsenteres.

LITTERATUR

- (1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (1) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K og Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. *Current Protocols in Toxicology* 39: 1-36.
- (2) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. *Water Research* 16: 457-464.
- (4) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T og Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1925-1930.
- (5) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T og Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology og Chemistry* 20: 2552-2560.
- (6) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H og Honjo T. (2002). Effects of 17 β -Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Chemosphere* 47: 71-80.
- (7) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H og Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1692-1698.
- (8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H og Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-Tert-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1487-1496.
- (9) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M og Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. *Aquatic Toxicology* 79: 288-295.

- (10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M og Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. *Aquatic Toxicology* 77: 78-86.
- (11) Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T og Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Journal of Applied Toxicology* 35:11-23.
- (12) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Tilgængelig på: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>.
- (13) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P og McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity test. *Chemosphere* 86: 593-599.
- (14) OECD draft (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (15) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ og Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Aquatic Toxicology* 76: 69–92.
- (16) Denny JS, Spehar RL, Mead KE og Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
- (17) Koger CS, Teh SJ og Hinton DE. (1999). Variations of Light og Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Biology of Reproduction* 61: 1287-1293.
- (18) Kinoshita M, Murata K, Naruse K og Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.
- (19) Gormley K og Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 330-338.
- (20) Kapitel C.15 i dette bilag, Fisk, korttidstoksicitetstest udført på fiskeembryoner og blommesækkyngel.

- (21) Kapitel C.37 i dette bilag, 21-dages assay med fisk: En korttidsscreeningstest for østrogene og androgene virkninger og aromatasehæmning.
- (22) Kapitel C.41 i dette bilag, Test af fisks kønsudvikling.
- (23) Kapitel C.48 i dette bilag, Assay for fisks reproduktion på kort sigt.
- (24) Kapitel C.47 i dette bilag, Toksicitetstest med fisk i de tidlige udviklingsstadier.
- (25) Kapitel C.49 i dette bilag, Test af akut toksicitet for fiskeembryoner (FET).
- (26) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L og Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067-1076.
- (27) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M og Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301-308.
- (28) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (29) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M og Scharl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245-251.
- (30) Shinomiya, A, Otake H, Togashi K, Hamaguchi S og Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, *Zoological Science* 21: 613-619.
- (31) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.
- (32) Green JW, Springer TA, Saulnier AN og Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108-1116.

Tillæg 1

DEFINITIONER

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (enzymkoblet immunadsorptionsassay).

Frugtbarhed = antal æg.

Fertilitet = antal levedygtige æg/frugtbarhed.

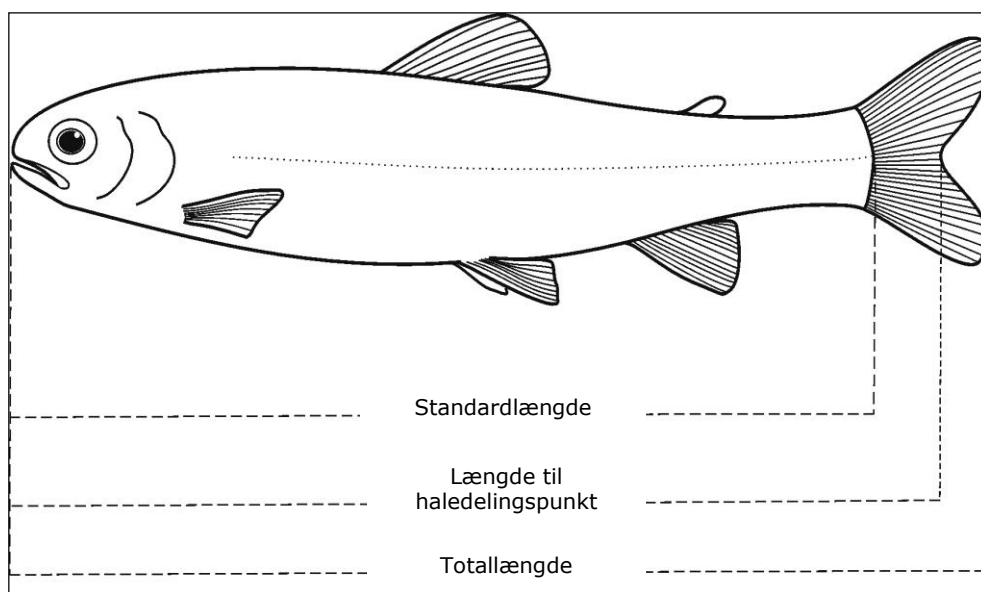
Længde til haledelingspunkt (FL) angiver længden fra snudespids til enden af halefinnens midterste finnestråle og bruges ved fisk, hvor det er svært at afgøre, hvor rygsøjlen ender, www.fishbase.org.

Klækningsevne = fiskeyngel/antal tilførte embryoner i en inkubator.

IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee.

Standardlængde (SL) angiver længden af en fisk målt fra snudespids til bagkanten af den sidste ryghvirvel eller bagkanten af den midtlaterale del af hypuralpladen. Denne måling udelukker ganske enkelt halefinnens længde (www.fishbase.org).

Totallængde (TL) angiver længden fra snudespids til halefinnens længste spids, sædvanligvis målt med spidserne komprimeret langs midterlinjen. Det er et lineært mål, og der måles ikke langs kroppens kurve (www.fishbase.org).



Figur 1: Beskrivelse af de forskellige anvendte længder

ECx: (effekt-koncentration for x % virkning) er den koncentration, der har en virkning på x % på testorganismer inden for en given eksponeringsperiode sammenlignet med en kontrol. F.eks. er EC50 en koncentration, der skønnes at have en virkning på testens endepunkt hos 50 % af en eksponeret population i en fastlagt eksponeringsperiode.

Gennemstrømningstest er en test med en stadig strøm af testopløsninger gennem testsystemet under hele eksponeringen.

HPG-akse: hypothalamus-hypofyse-gonadeakse.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.

Belastningsgrad: fiskenes vådvægt pr. vandvolumen.

Laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) er den laveste koncentration af et testkemikalie, som i testen har vist sig at have en statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$) sammenlignet med kontrollen. Imidlertid skal alle undersøgte koncentrationer, der ligger over LOEC, have haft en skadelig virkning, som er større end eller lig med den, der er observeret ved LOEC. Er disse to betingelser ikke opfyldt, bør der fyldestgørende redegøres for, hvordan den pågældende LOEC (og dermed NOEC) er valgt. Tillæg 5 og 6 indeholder retningslinjer.

Middel letal koncentration 50 (LC50): den koncentration af testkemikaliets, som skønnes at være dødelig for 50 % af testorganismerne i løbet af testens varighed.

Koncentration uden observeret effekt (NOEC) er den testkoncentration umiddelbart under LOEC, som ved sammenligning med kontrollen ikke har nogen statistisk signifikant effekt ($p < 0,05$) inden for en given eksponeringstid.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Bestandstæthed: antallet af fisk pr. vandvolumen.

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

UVCB: Stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

VTG: vitellogenin er en phospholipid-glycoprotein-prækursor for æggeblommeprotein, der normalt forekommer hos seksuelt aktive hunner af alle æglæggende arter.

WPF: uger efter befrugtning

Tillæg 2**NOGLE KEMISKE EGENSKABER FOR ACCEPTABELT FORTYNDINGSVAND**

Stof	Koncentrationsgrænse
Partikler	5 mg/l
Organisk kulstof i alt	2 mg/l
Ikke-ioniseret ammoniak	1 µg/l
Restchlor	10 µg/l
Organophosphorpesticider i alt	50 ng/l
Chlorerede organiske pesticider + polychlorbiphenyler i alt	50 ng/l
Organisk chlor i alt	25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Kobolt	1 µg/l
Kobber	1 µg/l
Jern	1 µg/l
Bly	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Zink	1 µg/l
Cadmium	100 ng/l
Kviksølv	100 ng/l
Sølv	100 ng/l

Tillæg 3**TESTBETINGELSER FOR MEOGRT**

1. Anbefalet art	Japansk risfisk (<i>Oryzias latipes</i>)
2. Testtype	Gennemstrømningstest
3. Vandtemperatur	Den nominelle testtemperatur er 25 °C. Gennemsnitstemperaturen i hver enkelt beholder er 24-26 °C.
4. Belysningskvalitet	Fluorescerende pærer (bredspektrede og ~150 lumen/m ²) (~150 lux). 16 t. lys, 8 t. mørke
6. Belastningsgrad	F0: 2 voksne/replikat F1: startes med højst 20 æg (embryoner)/replikat, reduceret til 12 embryoner/replikat ved klækning, derefter 2 voksne (XX-XY ynglepar) ved 9-10 uger efter befrugtning til reproduktionsfasen
7. Det mindste brugbare testkammervolumen	1,8 l (f.eks. testkammerstørrelse: 18x9x15 cm)
8. Volumenudskiftning af testopløsninger	Minimum 5 volumenfornyelser/dag og op til 16 volumenudskiftninger/dag (eller gennemstrømning på 20 ml/min.)
9. Testorganismernes alder ved start	F0: > 12 uger efter befrugtning, men det anbefales, at de ikke er ældre end 16 uger efter befrugtning
10. Antal organismer pr. replikat	F0: 2 fisk (par med en han og en hun); F1: maksimum 20 fisk (æg)/replikat (avlet af F0 og F1 ynglepar).
11. Antal behandlinger	5 testkemikaliebehandlinger plus passende kontrol(ler)
12. Antal replikater pr. behandling	Minimum 6 replikater pr. behandling for testkemikaliets og minimum 12 replikater for kontrollen og for kontrolkulturen med opløsningsmiddel, hvis der anvendes en sådan (antallet af replikater fordobles i reproduktionsfasen i F1)
13. Antal organismer pr. test	Minimum 84 fisk i F0 og 504 i F1. (Hvis der anvendes en kontrolkultur med opløsningsmiddel, så 108 fisk i F0 og 648 fisk i F1). Den enhed, der tælles, er post-eleutheroembryon.
14. Fodring	Fiskene fodres med saltsøkrebs af arten <i>Artemia</i> spp. (24 timer gamle nauplii) ad libitum, om nødvendigt suppleret med foder i flager, der er kommercielt tilgængeligt (et eksempel på en fodringsplan, der skal sikre en passende vækst og udvikling for at sikre en sund reproduktion, findes

i tillæg 6).

- | | |
|--------------------------------------|---|
| 15. Beluftning | Ingen, medmindre den opløste ilt nærmer sig <60 % af luftmætningsværdien. |
| 16. Fortyndingsvand | Rent overflade- eller brøndvand, rekonstitueret vand eller afchloret ledningsvand. |
| 17. Eksponeringsperiode | Primært 19 uger (fra F0 til klækning af F2) |
| 18. Biologiske endepunkter (primære) | Klækningsevne (F1 og F2); overlevelse (F1, fra klækning til 4 uger efter befrugtning (slutning af larvestadiet/begyndelse af ungfiskestadiet) fra 4 til 9 (eller 10) uger efter befrugtning (begyndelse af ungfiskestadiet til næsten fuldvoksenstadiet) og fra 9 til 15 uger efter befrugtning (næsten fuldvoksenstadiet til aflivning af voksne fisk)); vækst (F1, længde og vægt 9 og 15 uger efter befrugtning); sekundære køns karakteristika (F1, papillære strukturer på gatfinnen 9 og 15 uger efter befrugtning); vitellogenin (F1, <i>vtg</i> mRNA eller VTG protein 15 uger efter befrugtning); fænotypisk køn (F1, via kønskirtelhistologi 15 uger efter befrugtning); reproduktion (F0 og F1, frugtbarhed og fertilitet i 21 dage); tid til gydning (F1); og histopatologi (F1, kønskirtel, lever og nyrer 15 uger efter befrugtning). |
| 19. Valideringskriterier for testen | Opløst ilt på ≥ 60 % af luftmætningsværdien; gennemsnitlig vandtemperatur på 24-26 °C under hele testen; vellykket reproduktion på ≥ 65 % hunner i kontrollen/kontrollerne; gennemsnitlig daglig frugtbarhed på ≥ 20 æg i kontrollen/kontrollerne; klækningsevne på ≥ 80 % (gennemsnit) i kontrolgrupperne (i hver enkelt F1 og F2); overlevelse efter klækning og indtil 3 uger efter befrugtning på ≥ 80 % (gennemsnit) og fra 3 uger efter befrugtning til aflivning for generationen på ≥ 90 % (gennemsnit) i kontrolgrupperne (F1), koncentrationer af testkemikaliet i opløsningen skal opretholdes tilfredsstillende inden for ± 20 % af de gennemsnitlige målte værdier. |

Tillæg 4

RETNINGSLINJER FOR DE TYPISKE KONTROLVÆRDIER

Det bemærkes, at disse kontrolværdier er baseret på et begrænset antal valideringsundersøgelser og kan blive ændret i lyset af de erfaringer, der indhøstes fremover.

Vækst

Vægt- og længdemålinger foretages for alle de fisk, der er udtaget til prøve 9 (eller 10) og 15 uger efter befrugtning. Hvis denne protokol følges, vil det give en forventet vådvægt 9 uger efter befrugtning på 85-145 mg for hanner og 95-150 mg for hunner. Den forventede vægt 15 uger efter befrugtning er 250-330 mg for hanner og 280-350 mg for hunner. Selvom der kan forekomme betydelige afvigelser fra disse værdier i de enkelte fisk, kan en gennemsnitsvægt i kontrolgruppen, der ligger væsentligt uden for disse intervaller, især hvis den er lavere, tyde på problemer med fodring, temperaturkontrol, vandkvalitet, sygdom eller en kombination af disse faktorer.

Klækning

En klækning i kontrolgruppen ligger typisk på omkring 90 %, men værdier så lave som 80 % er ikke usædvanlige. En klækning på under 75 % kan tyde på en utilstrækkelig bevægelse af æggene under udviklingen eller manglende omhu i håndteringen af æggene, som f.eks. manglende rettidig fjernelse af døde æg, som fører til svampeinfektion.

Overlevelse

Overlevelsesseraterne frem til 3 uger efter befrugtning fra klækning og efter 3 uger efter befrugtning er normalt 90 % eller derover for kontrolgrupperne, men overlevelsesserater i de tidlige livsstadier helt ned til 80 % er ikke alarmerende. Overlevelsesserater i kontrolgrupperne på under 80 % giver anledning til bekymring og kan tyde på en utilstrækkelig rengøring af akvariet, hvilket fører til tab af larver på grund af sygdom eller kvælning på grund af lave mængder af opløst ilt. Dødelighed kan også forekomme som følge af skader i forbindelse med rengøring af beholderen og tab af larver i beholderens afløbssystem.

Vitellogeningenet

Mens de absolutte niveauer af *vitellogenin* (*vtg*) genet, udtrykt som kopier/ng af samlet mRNA, kan variere meget mellem laboratorierne på grund af de procedurer eller instrumenter, der anvendes, bør mængden af *vtg* være omkring 200 gange højere i hunner i kontrolgruppen end i hanner i kontrolgruppen. Det er ikke usædvanligt, at dette forhold er så højt som 1 000 til 2 000, men et forhold på under 200 er mistænkeligt og kan tyde på problemer med kontaminering af prøven eller problemer med den anvendte procedure og/eller de anvendte reagenser.

Sekundære kønskarakteristika

For hanner er det normale interval for sekundære kønskarakteristika, defineret som et samlet antal segmenter i papillære strukturer på gatfinnens finnestråler, på 40-80 segmenter 9-10 uger efter befrugtning. 15 uger efter befrugtning bør intervallet for hanner i kontrolgruppen være omkring 80-120 og 0 for hunner i kontrolgruppen. Af uforklarlige årsager er der i sjældne tilfælde ingen papillære strukturer 9 uger efter befrugtning, men da alle hanner i kontrolgruppen udvikler papillære strukturer 15 uger efter befrugtning, skyldes dette højest sandsynligt forsinket udvikling. Tilstedeværelsen af papillære strukturer hos hunner i kontrolgruppen tyder på, at der er XX-hanner i populationen.

XX-hanner

Den normale baggrundsforekomst af XX-hanner i kulturen ser ud til at være omkring 4 % eller derunder ved 25 °C, idet forekomsten stiger med stigende vandtemperatur. Der bør tages skridt til at minimere andelen af XX-hanner i populationen. Da forekomsten af XX-hanner ser ud til at have en genetisk komponent og derfor er arvelig, er overvågning af bestanden og sikring af, at XX-hanner ikke anvendes til at opformere bestanden, en effektiv metode til at nedbringe forekomsten af XX-hanner i populationen.

Gydeaktivitet

Gydeaktiviteten i kontrolreplikaterne bør overvåges dagligt, inden der foretages en frugtbarhedsvurdering. Der kan foretages en kvalitativ visuel bedømmelse af kontrolparrene for tegn på gydeaktivitet. 12-14 uger efter befrugtning gyder de fleste kontrolpar. Et lavt antal gydende par på dette tidspunkt tyder på, at der er potentielle problemer med fiskenes sundhed, modenhed eller velfærd.

Frugtbarhed

Sunde, velfodrede japansk risfisk gyder 12-14 uger efter befrugtning normalt dagligt og producerer mellem 15 og 50 æg om dagen. Ægproduktionen for 16 af de anbefalede 24 kontrollynglepar (> 65 %) bør være mere end 20 æg pr. par om dagen og kan nå helt op på 40 æg om dagen. Et lavere antal kan tyde på umodne, underernærede eller usunde ynglepar.

Fertilitet

Procentdelen af befrugtede æg for kontrollyngleparrene er typisk i størrelsesordenen 90 %, idet endnu højere værdier ikke er usædvanlige. Fertilitetsrater på under 80 % for kontrollyngleparrene er mistænkelige og kan tyde på, at individerne er usunde, eller at forholdene ikke er optimale.

Tillæg 5

ET EKSEMPEL PÅ EN FODRINGSPLAN

Et eksempel på en fodringsplan, der skal sikre en passende vækst og udvikling for at sikre en sund reproduktion, findes i tabel 1. Afvigelser fra fodringsplanen kan være acceptable, men det anbefales, at de testes for at kontrollere, at en acceptabel vækst og reproduktion observeres. For at følge den foreslåede fodringsplan skal tørvægten af saltsøkrebs pr. volumen flydende fødemateriale med saltsøkrebs bestemmes forud for påbegyndelse af testen. Dette kan ske ved at afveje den definerede mængde flydende fødemateriale med saltsøkrebs, der er blevet tørret i 24 timer ved 60 °C i forvejede vægtskåle. For at beregne vægten af salt i det flydende fødemateriale tørres en tilsvarende mængde af den saltopløsning, der anvendes i det flydende fødemateriale, også og trækkes fra vægten af det tørrede flydende fødemateriale med saltsøkrebs. Alternativt kan saltsøkrebsene filtreres og skylles med destilleret vand inden tørring, hvorved der ikke længere er behov for at måle vægten af "blindprøven". Disse oplysninger anvendes til at omregne oplysningerne i tabellen fra saltsøkrebsenes tørvægt til det volumen flydende fødemateriale med saltsøkrebs, fiskene skal fodres med. Derudover anbefales det, at delprøver af flydende fødemateriale med saltsøkrebs vejes ugentligt for at kontrollere den korrekte tørvægt af de saltsøkrebs, som fiskene fodres med.

Tabel 1: Et eksempel på en fodringsplan

Tidspunkt (efter klækning)	Saltsøkrebs (mg tørvægt/fisk/dag)
Dag 1	0,5
Dag 2	0,5
Dag 3	0,6
Dag 4	0,7
Dag 5	0,8
Dag 6	1,0
Dag 7	1,3
Dag 8	1,7
Dag 9	2,2
Dag 10	2,8
Dag 11	3,5
Dag 12	4,2
Dag 13	4,5
Dag 14	4,8
Dag 15	5,2
Dag 16-21	5,6
Uge 4	7,7
Uge 5	9,0
Uge 6	11,0
Uge 7	13,5
Uge 8-aflivning	22,5

Tillæg 6

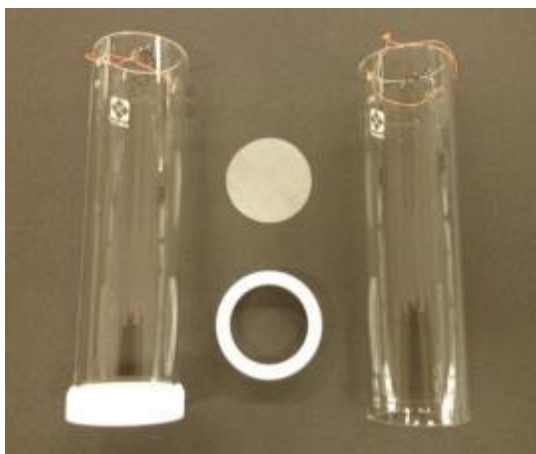
EKSEMPLER PÅ ET ÆGINKUBATIONSKAMMER

Eksempel A



Denne inkubator består af et glascentrifugeringsrør, der er overskåret på tværs, med en manchette af rustfrit stål, som holdes på plads af centrifugeringsrørets skrue låg. Et lille rør af glas eller rustfrit stål stikkes gennem låget og anbringes i nærheden af den afrundede bund og blæser forsigtigt luftbobler for at holde æggene flydende i vandet, således at overførslen af saprofytsvampe mellem æggene reduceres, samtidig med at udvekslingen af kemikalier mellem inkubatoren og beholderen lettes.

Eksempel B



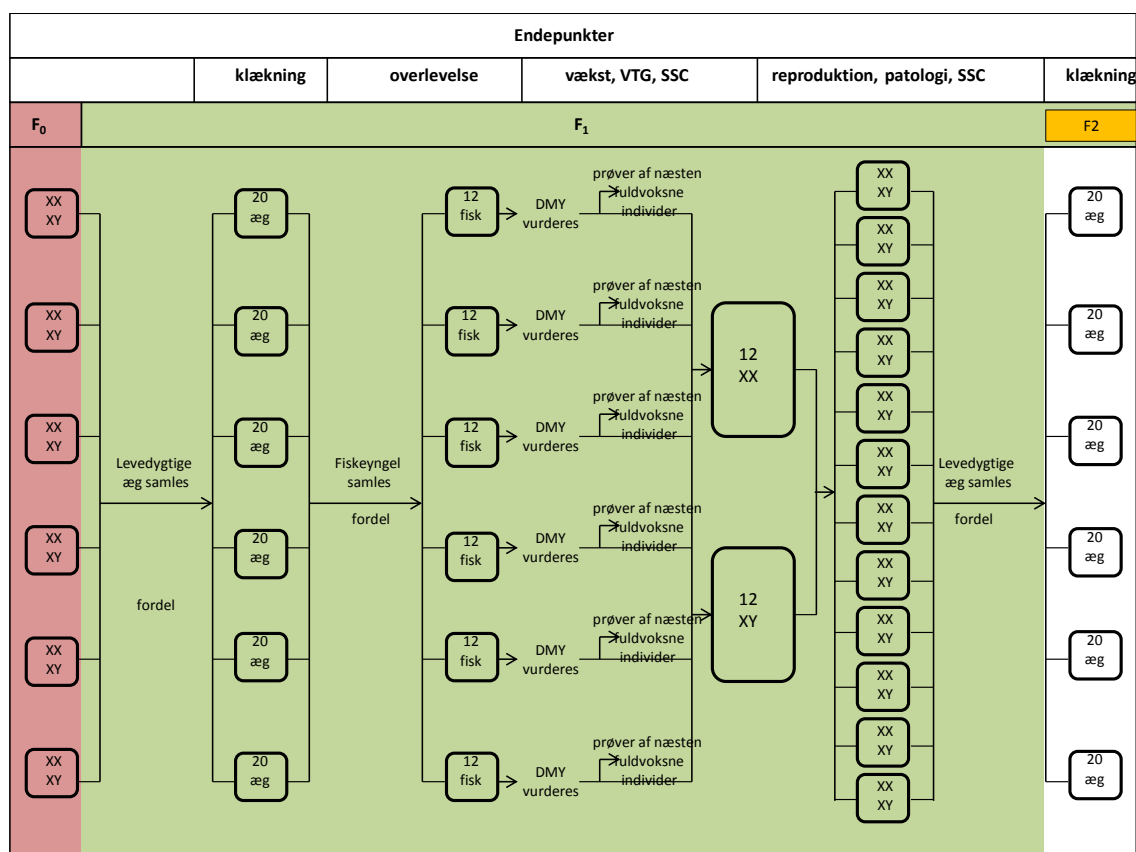


Denne inkubator består af en glascylinder (5 cm i diameter og 10 cm høj) og rustfrit trådnet (0,25 ϕ og 32 net), der er fastgjort til bunden af cylinderen med en PTFE-ring. Inkubatorerne ophænges fra løftestangen i beholderen og rystes vertikalt (omkring 5 cm udsving) i en passende cyklus (ca. en gang hvert 4. sekund) for æg af japansk risfisk.

Tillæg 7

SKEMATISK DIAGRAM OVER POOLING OG FORDELING I REPLIKATER UNDER MEOGRT-FORSØGSMETODEN

Figur 1: Pooling og omfordeling i replikater under MEOGRT. Denne figur repræsenterer en behandling eller halvdelen af en kontrol. På grund af pooling er replikatidentiteten ikke den samme i hele testen. Bemærk at ordet "æg" henviser til levedygtige, befrugtede æg (svarende til embryoner).



Behandlinger og replikation

Forsøgsmetoden anbefaler fem testkemikaliebehandlinger, idet der anvendes materiale af teknisk kvalitet og en negativ kontrol. Antallet af replikater pr. behandling forbliver ikke konstant under hele MEOGRT, og antallet af replikater i kontrolbehandlingen er det dobbelte af en enkelt testkemikaliebehandling. I F₀ har hver enkelt kemisk behandling seks replikater, mens den negative kontrolbehandling har 12 replikater. Det anbefales på det kraftigste, at der ikke anvendes opløsningsmidler, men hvis de anvendes, bør MEOGRT-rapporten indeholde en begrundelse for, hvorfor der anvendes et opløsningsmiddel, og for valget af opløsningsmiddel. Hvis der anvendes et opløsningsmiddel, er to typer kontroller desuden nødvendige: a) en kontrolkultur med opløsningsmiddel og b) en negativ kontrol. Disse to kontrolgrupper bør hver især bestå af et fuldt sæt af replikater på alle punkter i MEOGRT tidslinjen. Under hele udviklingen af testorganismen i F₁-generationen (og F₂

indtil klækning) forbliver denne replikatstruktur den samme. På det voksne stadium, hvor F1 yngleparrene sammensættes, vil det optimale være, at antallet af yngleparreplikater pr. behandling fordobles. Derfor er der op til 12 replikatpar i hver testkemikaliebehandling og 24 replikatpar i kontrolgruppen (og yderligere 24 replikatpar i kontrolkulturen med opløsningsmiddel, hvis det er relevant). Bestemmelsen af klækningen fra embryoner, der er gydet af F1-par, sker i den samme replikatstruktur som den, der blev anvendt i forbindelse med embryoner, der blev gydet af F0-par, hvilket betyder seks replikater pr. testkemikaliebehandling og 12 replikater i kontrolgruppen/kontrolgrupperne fra starten.

Tillæg 8

TÆLLING AF PAPILLÆRE STRUKTURER PÅ GATFINNEN

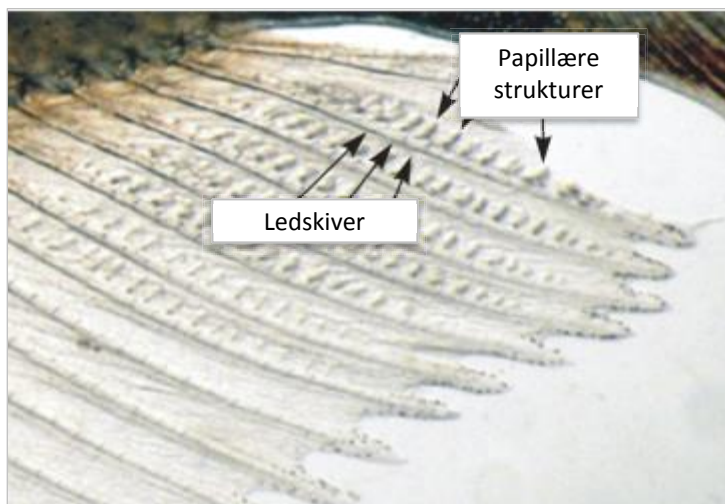
Vigtigste materialer og reagenser

- dissektionsmikroskop (med et påsat optisk kamera)
- fikseringsmiddel (f.eks. Davidson's (Bouins frarådes)), hvis der ikke tælles på grundlag af et billede.

Procedurer

Efter obduktion fotograferes gatfinnen, så papillære strukturer på gatfinnen nemt kan tælles. Selv om fotografering er den anbefalede metode, kan gatfinnen fikseres med Davidson's fikseringsmiddel eller et andet passende fikseringsmiddel i omkring 1 minut. Det er vigtigt, at gatfinnen ligger fladt under fikseringen, så papillære strukturer lettere kan tælles. Kroppen med gatfinnen kan opbevares i Davidson's fikseringsmiddel eller et andet passende fikseringsmiddel, indtil den skal analyseres. Tæl antallet af ledskiver (jf. **figur 1**) med papillære strukturer, der stikker ud fra bagkanten af ledskiven.

Figur 1: Papillære strukturer på gatfinnen



Tillæg 9

DETALJERET TIDSLINJE FOR MEOGRT

Testuge 1-3 (F0)

F0-generationen af ynglefisk, der har opfyldt udvælgelseskriterierne (jf. punkt 16-20), eksponeres i tre uger, således at det kønscelle- og kønskirtelvæv, der er under udvikling, eksponeres for testkemikaliet. Der er et enkelt ynglepar (XX-hun-XY-han ynglepar) i hver enkelt replikatbeholder. De gydede æg indsamles og tælles, og fertiliteten vurderes i 21 på hinanden følgende dage, begyndende på testdag 1.

Testuge 4 (F0 og F1)

De befrugtede og levedygtige æg (embryoner) bør helst indsamles på en enkelt dag. Hvis der ikke er embryoner nok, kan de imidlertid indsamles over to dage. Hvis de indsamles over to dage, samles alle de embryoner, der blev indsamlet den første dag, med de embryoner, der blev indsamlet den anden dag. Derefter fordeles det samlede antal embryoner for hver behandling vilkårligt i hver af replikatinkubatorerne med 20 embryoner pr. inkubator. Dødeligheden af befrugtede æg (embryoner) kontrolleres og registreres dagligt. Døde æg fjernes fra inkubatorerne (døde befrugtede æg er særligt i de tidlige stadier kendetegnet ved et tydeligt tab af gennemsigtighed og ændring i farve forårsaget af koagulation og/eller bundfældelse af proteiner, hvilket medfører en hvid uklarhed OECD 2010).

Bemærk: Hvis en enkelt behandling kræver indsamling på andendagen, skal alle behandlinger (herunder kontrollerne) følge denne procedure. Hvis der efter andendagen fortsat er et utilstrækkeligt antal embryoner i en behandling til, at der kan fordeles 20 embryoner i hver inkubator, nedsættes antallet af embryoner i denne specifikke behandling til 15 embryoner pr. inkubator. Hvis der ikke er nok embryoner til at fordele 15 i hver inkubator, nedsættes antallet af replikatinkubatorer, indtil der er nok embryoner til, at der kan overføres 15 til hver enkelt inkubator. Derudover kan der indsættes flere ynglepar pr. behandling og kontrol i F0 for at producere flere æg, så man når op på de anbefalede 20 pr. replikat.

På testdag 24 aflives F0-yngleparrene humant, og deres vægt og længde registreres. F0-yngleparrene kan om nødvendigt holdes i live i yderligere 1-2 dage med henblik på genopstart af F1.

Testuge 5-6 (F1)

Indtil en til to dage før den forventede klækning standses bevægelsen af de inkuberede æg for at fremskynde klækning. Efterhånden som embryonerne klækker hver dag, samles de pr. behandling og fordeles systematisk i hver enkelt replikatlarvebeholder i en specifik behandling med højst 12 fiskeyngelindivider. Dette sker via en vilkårlig udvælgelse af fiskeyngel, hvorefter et stk. anbringes i replikater ved en tilfældig udvælgelse, idet de

specifikke behandlingsreplikater inden for behandlingen gennemgås i rækkefølge, indtil alle replikater har 12 fiskeyngelindivider. Hvis der ikke er nok fiskeyngel til at fylde alle replikaterne, sikres det, at så mange replikater som muligt har 12 fiskeyngelindivider til at påbegynde F1-stadiet.

De æg, der ikke er klækket inden for to gange mediandagen for klækning i kontrollen, betragtes som ikke-levedygtige og kasseres. Antallet af fiskeyngelindivider registreres, og klækningssucces (klækningsevnen) beregnes for hvert replikat.

Testuge 7-11 (F1)

Larvernes overlevelse kontrolleres og registreres dagligt. På testdag 43 registreres antallet af overlevende fisk i hvert replikat samt det oprindelige antal fiskeyngelindivider, der blev anbragt i replikatet (nominelt 12). Dette gør det muligt at beregne den procentuelle overlevelse fra klækning til næsten fuldvoksen.

Testuger (F1)

På testdag 78-85 udtages en lille prøve af rygfinnen på hver enkelt fisk med henblik på bestemmelse af individets genotypiske køn (dvs. finneklipping). Disse oplysninger anvendes til etablering af ynglepar.

Inden for tre dage efter bestemmelsen af hver enkelt fisks genotypiske køn, etableres der vilkårligt 12 ynglepar pr. behandling og 24 par pr. kontrol. To XX- og XY-fisk fra hvert replikat udvælges vilkårligt og samles efter køn, hvorefter de vilkårligt udvælges til etablering af ynglepar (dvs. XX-XY-par). Mindst 12 replikater pr. kemisk behandling og mindst 24 replikater pr. kontrol etableres med et ynglepar pr. replikat. Hvis et replikat ikke har enten to XX- eller to XY-fisk, der kan samles, hentes der fisk med det krævede genotypekøn fra andre replikater inden for behandlingen.

De resterende fisk (maksimum 8 fisk pr. replikat) aflives humanitært, og der udtages prøver til bestemmelse af de forskellige endepunkter for næsten fuldvoksne individer. *Dmy* data (XX eller XY) for alle de næsten fuldvoksne individer opbevares for at sikre, at alle endepunktsdata kan relateres til hver enkelt individuel fisks genetiske køn.

Testuge 13-14 (F1)

Eksposeringen fortsætter, efterhånden som de næsten fuldvoksne ynglepar udvikler sig til fuldvoksne individer. På testdag 98 (dvs. dagen før ægindsamlingen påbegyndes) fjernes æggene fra både akvarierne og hunnerne.

Testuge 15-17 (F1)

Gydede æg indsamles dagligt i 21 på hinanden følgende dage i hvert replikat og vurderes med hensyn til frugtbarhed og fertilitet.

Testuge 18 (gentagelse af testuge 4) (F1 og F2)

På testdag 120 foretages ægindsamlingen i hver replikatbeholder om morgenen. De indsamlede æg vurderes, og de befrugtede æg (filamenterne fjernes) fra hvert enkelt ynglepar samles for hver behandling og fordeles systematisk til æginkubationskamrene med 20 befrugtede æg i hver inkubator. Inkubatorerne kan anbringes i separate "inkubatortanke", der er etableret for hver enkelt behandling eller i den replikatbeholder, der efter klækning vil indeholde de klækkede larver. Embryonerne skal helst indsamles på en enkelt dag. Hvis der ikke er embryoner nok, kan de dog indsamles over to dage. Hvis de indsamles over to dage samles alle de embryoner i behandlingerne, der blev indsamlet den første dag, med de embryoner, der blev indsamlet den anden dag. Derefter fordeles det samlede antal embryoner for hver behandling vilkårligt i hver af replikatinkubatorerne med 20 embryoner pr. inkubator. Bemærk: Hvis en enkelt behandling kræver indsamling på andendagen, skal alle behandlingerne (herunder kontrollerne) følge denne procedure. Hvis der efter andendagen fortsat er et utilstrækkeligt antal embryoner i en behandling til, at der kan fordeles 20 embryoner i hver inkubator, nedsættes antallet af embryoner i denne specifikke behandling til 15 embryoner pr. inkubator. Hvis der ikke er nok embryoner til at fordele 15 i hver inkubator, nedsættes antallet af replikatinkubatorer, indtil der er nok embryoner til, at der kan overføres 15 til hver enkelt inkubator.

På testdag 121 (eller testdag 122 for at sikre, at F2 er godt påbegyndt) aflives F1-yngleparrene humannt, og de analyseres for endepunkterne for voksne individer. F1-yngleparrene kan om nødvendigt holdes i live i yderligere 1-2 dage med henblik på genopstart af F2.

Testuge 19-20 (F2)

Indtil en til to dage før den forventede klækning standses bevægelsen af de inkuberede æg for at fremskynde klækning. Hvis testen afsluttes ved afslutningen af F2-klækningen, tælles fiskeynglen hver dag og kasseres. (Embryoner, der ikke er klækket efter en forlænget inkubationstid, defineret som to gange mediandagen for klækning i kontrollen, betragtes som ikke-levedygtige.)

Tillæg 10

STATISTISK ANALYSE

De typer af biologiske data, der genereres i MEOGRT, er ikke unikke for denne, og bortset fra de patologiske data, er der udviklet mange egnede statistiske metoder til at foretage en korrekt analyse af tilsvarende data afhængigt af dataenes karakteristik, herunder normalitet, homogenitetsvarians, om undersøgelsesdesignet åbner mulighed for hypotesetestning eller regressionsanalyse, parametriske test i forhold til ikke-parametriske test osv. Generelt følger de foreslåede statistiske analyser OECD's anbefalinger vedrørende økotoxicitetsdata (OECD 2006), og et beslutningsflowdiagram for MEOGRT dataanalyse findes i figur 2.

Det antages, at datasættene oftest vil udvise monotoniresponser. Derudover bør spørgsmålet om anvendelse af en ensidet statistisk test i forhold til en tosidet statistisk test overvejes. Medmindre der findes en biologisk begrundelse for, at en ensidet test er uegnet, foreslås det, at der anvendes en ensidet test. I det følgende afsnit anbefales visse statistiske test, men hvis der udvikles mere hensigtsmæssige og/eller statistiske metoder med større styrke, som kan anvendes på de specifikke data, der genereres i MEOGRT, anvendes disse statistiske test for at udnytte disse fordele.

MEOGRT data bør analyseres separat for hvert genotypiske køn. Der findes to strategier til analysering af data fra fisk, der har skiftet køn (enten XX-hanner eller XY-hunner). 1) Alle data fra fisk, der har skiftet køn, kasseres i hele testen med undtagelse af prævalensen af kønsskifte i hvert replikat. 2) Alle data fra fisk, der har skiftet køn, bevares i datasættet og analyseres på grundlag af genotype.

Histopatologiske data

Histopatologiske data registreres som alvorsgrad, som evalueres ved hjælp af en nyligt udviklet statistisk procedure, Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS), (Green *et al.*, 2014). *Rao-Scott* justering bevarer testreplikationsoplysninger; *by Slices*-proceduren indarbejder den biologiske forventning, at alvorsgrad har tendens til at stige med stigende behandlingskoncentrationer. For hver enkelt diagnose specificerer RSCABS-resultatet, hvilke behandlinger der har en højere prævalens af patologi end kontrolgruppen, og den tilknyttede alvorsgrad.

Frugtbarhedsdata

Analyse af frugtbarhedsdata består i en step-down Jonckheere-Terpstra eller Williams-test med henblik på bestemmelse af behandlingseffekterne, hvis dataene er i overensstemmelse med en monoton koncentration/respons. Med en step-down test foretages alle sammenligningerne ved et signifikansniveau på 0,05, og der foretages ingen tilpasning for antallet af foretagne sammenligninger. Dataene forventes at være overensstemmende med en monoton koncentration/respons, men dette kan kontrolleres enten ved visuel kontrol af dataene eller ved at etablere lineære og kvadratiske kontraster mellem behandlingsgennemsnit efter en rangordentransformering af dataene. Medmindre den

kvadratiske kontrast er signifikant, og den lineære kontrast ikke er signifikant, er trendtesten færdig. I modsat fald anvendes Dunnetts test til at bestemme behandlingseffekterne, hvis dataene er normalfordelt med homogen varians. Er disse krav ikke opfyldt, anvendes Dunns test med en Bonferonni-Holm justering. Alle de anførte test foretages uafhængigt af eventuelle generelle F- eller Kruskal-Wallis-test. Nærmere oplysninger findes i OECD 2006.

Der kan anvendes alternative metoder som f.eks. en generel lineær model med Poisson errors for egg counts (uden transformering), hvis det er begrundet i statistisk henseende (Cameron og Trividi, 2013). Statistisk rådgivning anbefales, hvis der anvendes en alternativ tilgang.

Daglig ægtælling i en enkelt generation

I ANOVA-modellen er $Y = \text{Tid} * \text{Tid} + \text{Behandling} + * \text{Behandling} + \text{Tid} * \text{Behandling} + * \text{Tid} * \text{Behandling}$, med vilkårlige effekter i replikat (generation*behandling), og Tid*Replikat (behandling), der tager højde for uensartede varianskomponenter af begge typer mellem generationerne. Her henviser Tid til hyppigheden af ægtællingerne (f.eks. dag eller uge). Dette er en gentagen måleanalyse med korrelationer mellem observationerne i de samme replikater under hensyntagen til dataenes karakter af gentagne målinger.

Hovedeffekterne af behandlingen testes ved hjælp af Dunnetts (eller Dunnett-Hsu) test, som justerer for antallet af sammenligninger. Der er behov for justeringer for hovedeffekten af generation eller tid, for der findes ikke noget "kontrol"-niveau for disse to faktorer, og hvert niveaupar er en sammenligning af mulig interesse. For disse to hovedeffekter gælder det, at hvis F-testen for hovedeffekten er signifikant ved 0,05, kan de parvise sammenligninger af denne faktor på tværs af niveauerne testes ved 0,05 uden yderligere justering.

Modellen omfatter interaktion mellem to og tre faktorer, således at en hovedeffekt for f.eks. tid måske ikke er signifikant, selv om tid har en væsentlig indflydelse på resultaterne. Hvis en interaktion mellem to eller tre faktorer, der omfatter tid, er signifikant ved 0,05, kan sammenligninger af tidsniveauer ved 0,05 accepteres uden yderligere justering.

Dernæst kommer F-test for behandlingens signifikans inden for tidsperioden, de såkaldte "slices" i ANOVA-tabellen. Hvis f.eks. "slice" for behandling i F1 og tid 12 er signifikant ved 0,05, kan de parvise sammenligninger for behandling i F1 og tid 12 accepteres ved 0,05 uden yderligere justering. Tilsvarende erklæringer gælder for test for tid i F1 og behandling og for generation i en tidsperiode og behandling.

Når der er tale om sammenligninger, der ikke henhører under nogen af de ovenstående kategorier, bør sammenligningerne endelig justeres ved hjælp af Bonferroni-Holm-justering til p-værdier. Yderligere oplysninger om analyse af sådanne modeller kan findes i Hocking (1985) og Hochberg og Tamhane (1987).

Alternativt registreres rådataene, og de fremlægges i testrapporten som frugtbarhed (antal æg) pr. replikat/dag. Replikatgennemsnittet af rådataene bør beregnes, hvorefter der

anvendes en kvadratrods transformation. En ensidet ANOVA af de transformerede replikatgennemsnit bør beregnes efterfulgt af Dunnett-kontraster. Det kan også være en hjælp at foretage en visuel kontrol af frugtbarhedsdata for hver behandling og/eller hvert replikat med spredningsplot, der viser dataene over tid. Dette vil muliggøre en uformel vurdering af de potentielle effekter over tid.

Alle andre biologiske data

De statistiske analyser er baseret på den underliggende antagelse, at dataene med en korrekt dosisbestemmelse vil være monotone. Dataene antages således at være monotone, og de evalueres formelt for monotonit ved hjælp af lineære og kvadratiske kontraster. Hvis dataene er monotone, anbefales en Jonckheere-Terpstra trend test af replikatgennemsnit (som tilrådet i OECD 2006). Hvis den kvadratiske kontrast er signifikant, og den lineære kontrast ikke er signifikant, anses dataene for ikke at være monotone.

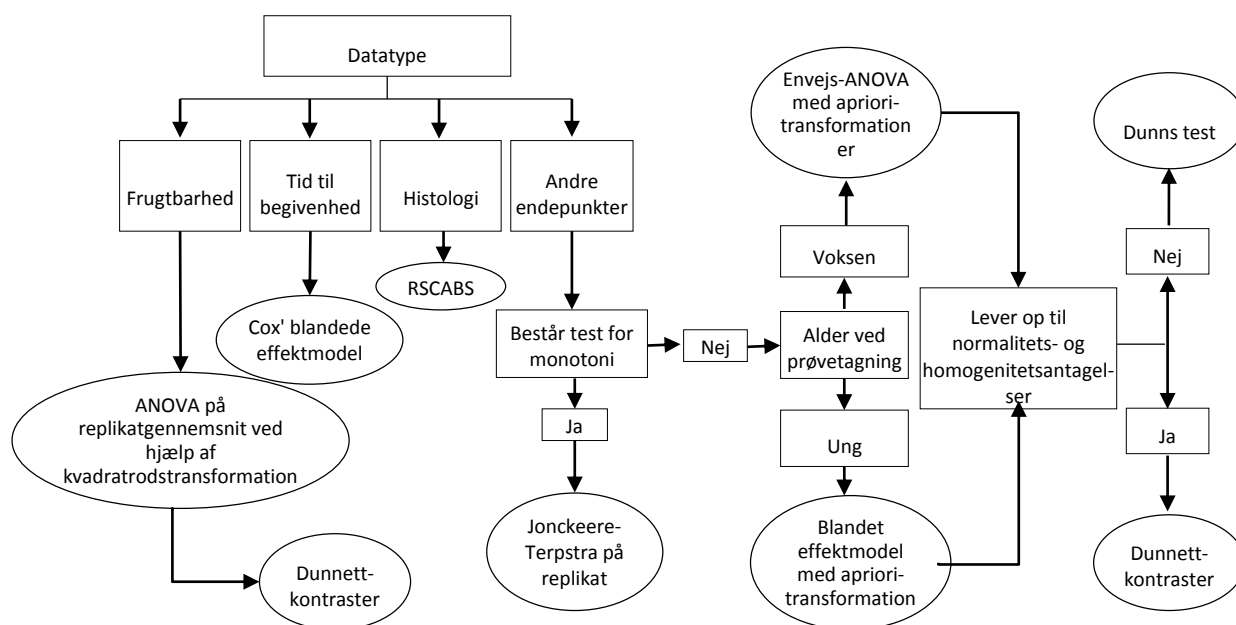
Hvis dataene ikke er monotone, navnlig på grund af nedsat respons ved den højeste behandling eller de to højeste behandlinger, bør det overvejes at kassere datasættet, så analysen foretages uden disse behandlinger. Denne beslutning træffes efter en faglig bedømmelse og på grundlag af alle tilgængelige data, særlig data, der indikerer åbenlys toksicitet ved disse behandlingsniveauer.

Der anbefales ingen transformationer for så vidt angår vægt og længde, selv om det til tider kan være nødvendigt. Der anbefales imidlertid en logaritmisk transformation i forbindelse med vitellogenindataene; der anbefales en kvadratrods transformation af SSC data (papillære strukturer på gatfinnen); en arcsin-kvadratrods transformation anbefales for data om klækningstal, procent overlevelse, kønsratio og procent befrugtede æg. Tid til klækning og tid til første gydning bør behandles som tid til hændelse-data, idet de enkelte embryoner, der ikke klækker inden for den definerede periode, eller replikater, der aldrig gydede, behandles som højrecensurerede data. Tid til klækning bør beregnes på grundlag af mediandagen for klækning i hvert replikat. Disse endepunkter bør analyseres ved hjælp af Cox' blandede effektmodel for fare (mixed-effects Cox proportional hazard model).

De biologiske data fra voksne prøver har en måling pr. replikat, dvs. der er en XX-fisk og en XY-fisk pr. replikatakvarium. Det anbefales derfor, at der foretages en envejs-ANOVA på replikatgennemsnittene. Hvis antagelserne i ANOVA (normalitet og varianshomogenitet som vurderet på grundlag af residualer i ANOVA ved henholdsvis Shapiro-Wilks-test og Levene-test) er opfyldt, bør Dunnett-kontraster anvendes til at bestemme de behandlinger, der var forskellige fra kontrollen. Hvis antagelserne i ANOVA derimod ikke er opfyldt, bør der foretages en Dunns test med henblik på at bestemme, hvilke behandlinger der var forskellige fra kontrollen. En tilsvarende procedure anbefales for data, der er angivet i procent (fertilitet, klækning og overlevelse).

De biologiske data fra næsten fuldvoksne prøver har fra 1 til 8 målinger pr. replikat, dvs. at der kan være et variabelt antal individer, der bidrager til replikatgennemsnittet for hvert genotypisk køn. Derfor anbefales det, at der anvendes en blandet ANOVA-model efterfulgt af Dunnett-kontraster, hvis antagelserne om normalitet og varianshomogenitet var opfyldt

(for residualer af den blandede ANOVA-model). Hvis antagelserne derimod ikke var opfyldt, bør der foretages en Dunns test med henblik på at bestemme, hvilke behandlinger



der var forskellige fra kontrollen.

Figur 2: Flowdiagram over de anbefalede statistiske procedurer for MEOGRT dataanalyse.

Litteratur

- (1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.
- (2) Cameron AC og Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.
- (3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.
- (4) Hochberg Y og Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

C.53 LARVAL AMPHIBIAN GROWTH AND DEVELOPMENT ASSAY (LAGDA) (ASSAY FOR AMFIBIELARVERS VÆKST OG UDVIKLING)

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning 241 (2015). Behovet for at udvikle og validere et assay, der kan identificere og karakterisere de negative konsekvenser af eksponering for giftige kemikalier hos amfibier, udspringer af bekymringer for, at kemikalieniveauerne i miljøet kan være til skade for både mennesker og dyre- og planteliv. OECD Test Guideline of the Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA) beskriver en toksicitetstest med en amfibiart, der ser på vækst og udvikling fra befrugtning til tidlig ungdom. Det er et assay (typisk 16 uger), der vurderer tidlig udvikling, metamorfose, overlevelse, vækst og delvis kønsmodning. Det gør det ligeledes muligt at måle en række andre endepunkter med henblik på diagnostisk evaluering af stoffer, der mistænkes for at være hormonforstyrrende, eller andre former for udviklings- og reproduktionsforstyrrende stoffer. Den metode, der er beskrevet i denne forsøgsmetode, er baseret på valideringsarbejde på afrikansk sporefrø (*Xenopus laevis*) foretaget af U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) med støttearbejde udført i Japan (1). Selv om andre amfibiarter kan tilpasses en vækst- og udviklingstestprotokol, i hvilken muligheden for at bestemme det genetiske køn er en vigtig komponent, finder de specifikke metoder og observationsbaserede endepunkter i denne forsøgsmetode kun anvendelse på *Xenopus laevis*.
2. LAGDA fungerer som en efterfølgende test med en amfibiart med henblik på indsamling af mere detaljerede koncentration/responsoplysninger om negative virkninger, der er egnet til brug ved fareidentifikation og -karakterisering og ved vurdering af den økologiske risiko. Assayet stemmer overens med niveau 4 i OECD's Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters, hvor *in vivo* assays også giver data om negative virkninger på endepunkter vedrørende hormonforstyrrende virkninger (2). Det generelle testdesign indebærer, at embryoner af *X. laevis* ved Nieuwkoop and Faber (NF) stadium 8-10 (3) eksponeres for minimum fire forskellige koncentrationer af testkemikali (generelt fordelt på ikke under halvlogaritmiske intervaller) og kontrol/kontroller indtil 10 uger efter mediantiden til NF stadium 62 i kontrollen med en mellemliggende delprøve ved NF stadium 62 (≤ 45 efter befrugtning; normalt omkring 45 dage (dpf)). Der er fire replikater for hver testkoncentration og otte replikater i kontrolgruppen. De endepunkter, der evalueres i løbet af eksponeringen (ved mellemliggende delprøve og slutprøve ved testens afslutning), omfatter de endepunkter, der tyder på en generel toksicitet: dødelighed, unormal adfærd og vækstdeterminanter (længde og vægt), samt endepunkter, der er udformet med henblik på karakterisering af specifikke hormonforstyrrende virkemåder, der

rammer østrogen-, androgen- eller skjoldbruskkirtelmedierede fysiologiske processer. Metoden lægger primært vægt på de potentielle populationsrelevante virkninger (dvs. negative virkninger på overlevelse, udvikling, vækst og reproduktion) med henblik på beregning af koncentrationen uden observeret effekt (NOEC) eller en effektkoncentration, der forårsager x % ændring (ECx) i det målte endepunkt. Det skal dog bemærkes, at ECx-tilgange sjældent er egnede til større studier af denne art, hvor en forøgelse af testkoncentrationerne med henblik på bestemmelse af det ønskede ECx kan være upraktiske. Det bemærkes ligeledes, at metoden ikke dækker selve reproduktionsfasen. De definitioner, der er anvendt i denne forsøgsmetode, er anført i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

3. På grund af det begrænsede antal kemikalier, der testes, og det begrænsede antal laboratorier, der er involveret i valideringen af dette ret komplekse assay, er særlig forsøgsdataenes reproducerbarhed mellem laboratorier endnu ikke blevet dokumenteret, og det forventes, at OECD-testvejledning 241 vil blive gennemgået og om nødvendigt revideret i lyset af de indhøstede erfaringer, når der foreligger et tilstrækkeligt antal undersøgelser til, at virkningen af dette nye testdesign kan fastslås. LAGDA er et vigtigt assay i forbindelse med de potentielle bidragydere til tilbagegangen i amfibiepopulationen, idet det evaluerer virkningerne af eksponering for kemikalier i det følsomme larvestadium, hvor virkningerne på overlevelse og udvikling, herunder normal udvikling af kønsorganerne, kan påvirke populationerne i negativ retning.
4. Testen er designet til at påvise en apikal effekt/apikale effekter som følge af såvel hormonforstyrrende som ikke-hormonforstyrrende mekanismer, og omfatter diagnosticeringsendepunkter, der er delvist specifikke for centrale endokrine mekanismer. Det bemærkes, at der, indtil LAGDA blev udviklet, ikke fandtes nogen validerede assays, der opfyldte dette formål for amfibier.
5. Inden assayet påbegyndes, er det vigtigt at indhente oplysninger om testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber, navnlig for at gøre det muligt at fremstille stabile kemikalieopløsninger. Det er også nødvendigt, at der findes en tilstrækkeligt følsom analysemetode til kontrol af koncentrationerne af testkemikaliets. Over en periode på omkring 16 uger kræver assayet i alt 480 dyr, dvs. *X. laevis* embryoner (eller 640 embryoner, hvis der anvendes en kontrolkultur med opløsningsmiddel) for at sikre, at testen har en tilstrækkelig styrke med hensyn til evaluering af populationsrelevante endepunkter såsom vækst, udvikling og kønsmodning.
6. Før brug af forsøgsmetoden til lovmæssig test af en blanding bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til det lovmæssige formål. Desuden vurderer dette assay ikke frugtbarheden direkte, så det kan måske ikke anvendes på et højere niveau end niveau

4 i OECD's konceptuelle ramme for test og vurdering af hormonforstyrrende kemikalier (Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters).

VIDENSKABELIGT GRUNDLAG FOR FORSØGSMETODEN

7. En stor del af vores nuværende forståelse af amfibiers biologi er indhøstet ved hjælp af laboratiemodellarten *X. laevis*. Denne art kan rutinemæssigt opdrættes i laboratorier, ovulationen kan induceres ved hjælp af human choriongonadotrophin (hCG), og forsøgsdyrene kan nemt anskaffes fra kommercielle avlere.
8. Som hos alle andre hvirveldyr styres amfibiers reproduktion af hypothalamus-hypofyse-gonadeaksen (HPG) (4). Østrogen og androgen er mediatorer i det endokrine system og styrer udviklingen og fysiologien af seksuel dimorfisme. Der findes tre særskilte stadier i amfibiers livscyklus, hvor denne akse er særligt aktiv: (1) differentiering af kønskirtelanlæg på larveudviklingsstadiet, (2) udvikling af sekundære køns karakteristika og modning af kønskirtler i ungdomsstadiet og (3) voksnes funktionelle reproduktion. Hvert af disse tre udviklingsvinduer vil kunne være udsat for hormonforstyrrelser fra visse kemikalier såsom østrogen og androgen, hvilket i sidste ende fører til tab af organismernes yngleevne.
9. Udviklingen af kønskirtlerne starter ved NF stadium 43, hvor den urogenitale kam først udvikles. Differentiering af kønskirtelanlæg starter ved NF stadium 52, hvor de primordiale germinalceller enten vandrer til medullært væv (hanner) eller forbliver i det kortikale område (hunner) af kønskirtelvævet under udvikling (3). Denne seksuelle differentieringsproces af kønskirtlerne blev først rapporteret som værende følsom over for kemiske ændringer hos *Xenopus* i 1950'erne (5) (6). Eksponering af haletudser for østradiol i denne periode af differentieringen af kønskirtelanlæggene resulterer i kønsskifte hos hannerne, som, når de er fuldt udvoksede, er fuldt funktionsdygtige hunner (7) (8). Et funktionelt kønsskifte af hunner til hanner er også muligt og er blevet rapporteret efter implantation af testisvæv i haletudser (9). Selv om eksponering for en aromatasehæmmer også forårsager et funktionelt kønsskifte hos *X. tropicalis* (10), har dette imidlertid ikke vist sig at være tilfældet hos *X. laevis*. Historisk set er de toksiske effekter på differentieringen af kønskirtelanlæg blevet bedømt på grundlag af vævsundersøgelser af kønskirtler ved metamorfose, og kønsskifte kunne kun bestemmes via en analyse af kønsfordelingen. Indtil for nylig fandtes der ingen metoder til direkte bestemmelse af det genetiske køn hos *Xenopus*. Påvisningen for nylig af markører for køn hos *X. laevis* gør det imidlertid muligt at bestemme det genetiske køn, ligesom en direkte identifikation af dyr, der har skiftet køn, er blevet mulig (11).
10. Hos hanner fortsætter udviklingen, efterhånden som testosteronniveauet i blodet stiger med udviklingen af de sekundære køns karakteristika og udviklingen af testis. Hos hunner

produceres østradiol i æggestokkene, hvilket resulterer i fremkomsten af vitellogenin (VTG) i plasmaet, vitellogenin oocytter i æggestokkene og udviklingen af æggeledere (12). Æggelederne er hunnens sekundære køns karakteristika, der spiller en rolle i oocytmodningen i reproduktionsfasen. Der lægges et gelelag på oocytterne, når de passerer gennem æggelederen og samles i en ægsæk klar til befrugtning. Udviklingen af æggeledere ser ud til at være reguleret af østrogener, da udviklingen er sammenfaldende med østradiolniveauet i blodet hos *X. laevis* (13) og *X. tropicalis* (12). Der er rapporteret om udvikling af æggeledere hos hanner efter eksponering for polyklorerede biphenyler (14) og 4-tert-octylphenol (15).

PRINCIP FOR TESTEN

11. Testdesignet indebærer, at *X. laevis* embryoner ved NF stadium 8-10 via vandet eksponeres for fire forskellige koncentrationer af testkemikaliet og kontroller indtil 10 uger efter mediantiden til NF stadium 62 i kontrollen med en mellemliggende delprøve ved NF stadium 62. Selv om det også er en mulighed at dosere yderst hydrofobe kemikalier via foderet, foreligger der indtil videre kun få erfaringer med denne eksponeringsvej i dette assay. Der er fire replikater for hver testkoncentration og otte replikater for hver kontrol, der anvendes. De endepunkter, der evalueres i løbet af eksponeringen, omfatter de endepunkter, der tyder på en generel toksicitet (dvs. dødelighed, unormal adfærd og vækstdeterminanter (længde og vægt), samt endepunkter, der er udformet med henblik på karakterisering af specifikke hormonforstyrrende virkemåder, der rammer østrogen-, androgen- eller skjoldbruskkirtelmedierede fysiologiske processer (f.eks. skjoldbruskkirtelhistopatologi, kønskirtelhistopatologi og ægge- og sædlederhistopatologi, unormal udvikling, plasmavitellogenin (valgfrít) og kønsfordelingen mellem genotype/fænotype).

VALIDERINGSKRITERIER FOR TESTEN

12. Følgende kriterier for testens gyldighed finder anvendelse:
 - Koncentrationen af opløst ilt skal være ≥ 40 % af luftmætningsværdien under hele testen.
 - Vandtemperaturen skal ligge på 21 ± 1 °C, og forskellene mellem replikater og behandlinger må ikke overstige 1,0 °C.
 - Testopløsningens pH skal holdes på mellem 6,5 og 8,5, og forskellen mellem replikater og behandlinger må ikke overstige 0,5.
 - Der skal være dokumentation for, at koncentrationerne af testkemikaliet i opløsning på tilfredsstillende måde er holdt inden for ± 20 % af gennemsnittet af de målte værdier.

- Dødeligheden i eksponeringsperioden skal være $\leq 20\%$ i hvert replikat i kontrollerne.
 - $\geq 70\%$ levedygtighed i den yngel, der udvælges til opstart af testen.
 - Mediantiden til NF stadium 62 i kontrollerne skal være ≤ 45 dage.
 - Testorganismernes gennemsnitsvægt ved NF stadium 62 og ved afslutningen af assayet i kontrollerne og kontrolkulturerne med opløsningsmiddel (hvis relevant) skal nå op på henholdsvis $1,0 \pm 0,2$ og $11,5 \pm 3$ g.
13. Selv om det ikke er et validitetskriterium, anbefales det, at mindst tre behandlingsniveauer med tre ukompromitterede replikater er tilgængelige for analyse. For høj dødelighed, der kompromitterer en behandling, defineres som > 4 døde ($> 20\%$) i to eller flere replikater, der ikke kan forklares ved en teknisk fejl. Mindst tre behandlingsniveauer uden åbenlys toksicitet bør være tilgængelige for analyse. Abnorm adfærd omfatter f.eks. at flyde på overfladen, ligge på bunden af beholderen, omvendt eller uregelmæssig svømning, manglende overfladeaktivitet og manglende respons på stimuli, morfologiske abnormaliteter (f.eks. misdannelse af lemmer), hæmoragiske læsioner og ødemer på maven.
14. Hvis der observeres en afvigelse fra validitetskriterierne for testen, bør konsekvenserne holdes op imod forsøgsresultaternes pålidelighed, og disse afvigelser og overvejelser bør fremgå af testrapporten.

BESKRIVELSE AF METODERNE

Apparatur

15. Normalt laboratorieudstyr og i særdeleshed følgende:

- a) temperaturkontrolapparater (f.eks. varme- eller køleanordninger (justerbar til $21\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$)
- b) termometer
- c) binokulært dissektionsmikroskop og dissektionsredskaber
- d) digitalkamera med en opløsning på mindst 4 megapixel og mikrofunktion (hvis nødvendigt)
- e) analysevægt, der kan måle ned til 0,001 mg eller 1 μg
- f) oxygenmeter og pH-meter
- g) lysintensitetsmåler til måling i lux-enheder.

Vand

Kilde og kvalitet

16. Der kan anvendes lokalt tilgængeligt fortyndingsvand (f.eks. kildevand eller trækulsfiltreret ledningsvand), som muliggør normal vækst og udvikling af *X. laevis*-haletudser, og der skal foreligge data om normal vækst i dette vand. Da den lokale vandkvalitet kan variere betydeligt fra det ene område til det andet, bør vandkvaliteten analyseres, især hvis der ikke foreligger historiske data om, hvorvidt vandet kan bruges til at opdrætte larver af amfibier. Målinger af tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), de vigtigste anioner og kationer (f.eks. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{4-}), pesticider, samlet mængde organisk kulstof og opslæmmede faste stoffer skal foretages før påbegyndelse af testen og/eller f.eks. hver sjette måned, såfremt man ved, at fortyndingsvandet har en relativt konstant kvalitet. I tillæg 2 er anført nogle kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand.

Iodidkoncentrationen i testvandet

17. For at få skjoldbruskkirtlen til at syntetisere TH til at understøtte en normal metamorfose skal der være tilstrækkeligt iodid tilgængelig for larverne gennem en kombination af vandige kilder og foderkilder. I øjeblikket er der ingen empirisk afledte retningslinjer for minimumsioididkoncentrationer i foder eller vand for at sikre en ordentlig udvikling. Iodidtilgængelighed kan dog påvirke skjoldbruskkirtelsystemets modtagelighed for thyreoideaaktive agenser og er kendt for at modulere skjoldbruskkirtlens basale aktivitet, som fortjener opmærksomhed ved fortolkning af resultaterne fra den histopatologiske undersøgelse af skjoldbruskkirtlen. På grundlag af tidligere arbejde har assayet vist sig at fungere godt, når iodidkoncentrationerne (I^-) i fortyndingsvandet ligger mellem 0,5 og 10 $\mu\text{g/l}$. Ideelt bør minimumsioididkoncentrationen i fortyndingsvandet ligge på 0,5 $\mu\text{g/l}$ under hele testen (tilsat som natrium- eller kaliumsalt). Hvis testvandet rekonstitueres på grundlag af demineraliseret vand, tilsættes iodid ved en minimumskoncentration på 0,5 $\mu\text{g/l}$. En eventuel tilsætning af iodid eller andre salte til testvandet (dvs. fortyndingsvandet) anføres i rapporten. Iodidindholdet kan også måles i foderet ud over i testvandet.

Eksponeringssystem

18. Testen blev udviklet ved hjælp af et gennemstrømningsfortyndersystem. De af systemets komponenter, der har vandkontakt, bør være af glas, rustfrit stål og/eller andre kemisk inerte materialer. Eksponeringsbeholderne bør være akvarier af glas eller rustfrit stål, som har et beholdervolumen på ca. 4,0-10,0 l (vanddybde på minimum 10-15 cm). Systemet bør kunne bære alle eksponeringskoncentrationer, en kontrol og en kontrolkultur med opløsningsmiddel, hvis det er relevant, med fire replikater pr. behandling og otte i kontrollerne. Gennemstrømningshastigheden i hver beholder bør være konstant i forhold til både opretholdelsen af biologiske vilkår og kemisk eksponering. Gennemstrømningshastigheden i hver beholder bør være konstant (f.eks. mindst 5

udskiftninger af hele beholderen pr. dag) for at undgå et fald i den kemiske koncentration på grund af både testorganismernes og de vandlevende mikroorganismers stofskifte eller abiotiske nedbrydningsveje (hydrolyse, fotolyse) eller spredning (fordampning, sorption). Behandlingsbeholderne placeres vilkårligt i eksponeringssystemet med henblik på at reducere potentielle virkninger af placeringen, bl.a. mindre variationer i temperatur, lysintensitet osv. For yderligere oplysninger om opsætning af gennemstrømningseksponeringssystemer henvises til ASTM Standard Guide for Conducting Acute Toxicity test on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians (16).

Kemikaliertilførsel: fremstilling af testopløsninger

19. Til fremstilling af testopløsningerne i eksponeringssystemet doseres stamopløsningen af testkemikaliets til eksponeringssystemet ved hjælp af en egnet pumpe eller et andet apparat. Stamopløsningens flowrate bør kalibreres i overensstemmelse med den analytiske bekræftelse af testopløsningerne før påbegyndelse af eksponeringen, og den kontrolleres regelmæssigt via volumenmåling under testen. Testopløsningen i hvert kammer bør fornyes med minimum 5 volumenfornyelser/dag.
20. Den anvendte metode til at indføre testkemikaliets i systemet kan variere alt efter dets fysisk-kemiske egenskaber. Før denne test benyttes, bør der derfor indhentes relevante basisoplysninger om kemikaliets for at afgøre testbarheden. Nyttige oplysninger om testkemikalietspecifikke egenskaber omfatter strukturformlen, molekylvægt, renhed, vand- og lysstabilitet, pK_a og K_{ow}, vandopløselighed (helst i testmediet) og damptryk samt resultaterne af en bestemmelse af let bionedbrydelighed (forsøgsmetode C.4 (17) eller C.29 (18)). Opløseligheden og damptrykket kan bruges til at beregne Henrys konstant, som angiver, om der kan forekomme et tab som følge af fordampning af testkemikaliets. Foreligger ovennævnte oplysninger ikke, bør det overvejes nøje, om testen skal foretages, da testdesignet vil afhænge af testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber, og uden disse data kan testresultaterne være vanskelige at fortolke eller meningsløse. En pålidelig analysemetode til kvantitativ bestemmelse af testkemikaliets i testopløsningerne med kendt og publiceret nøjagtighed og detektionsgrænse bør foreligge. Vandopløselige kemikalier kan opløses i delprøver af fortyndingsvandet ved en koncentration, der giver mulighed for tilførsel ved måltestkoncentrationen i et gennemstrømningssystem. Kemikalier, der er flydende eller faste ved rumtemperatur og moderat opløselige i vand, kræver eventuelt brug af væske:væske eller væske:fast stof (*f.eks.* mætningskolonner med glasuld) mætningssystem (19). Selv om det også er en mulighed at dosere meget hydrofobe testkemikalier via foderet, foreligger der indtil videre kun få erfaringer med den eksponeringsvej i dette assay.

21. Testopløsninger med de valgte koncentrationer fremstilles ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsningen bør fortrinsvis fremstilles ved en simpel mekanisk opblanding eller omrystning af testkemikaliet i fortyndingsvandet (f.eks. ved omrøring og/eller ultralydsbehandling). Mætningssøjler/-systemer eller passive doseringsmetoder (20) kan anvendes for at opnå en passende koncentration i stamopløsningen. Der skal helst benyttes et testsystem uden hjælpeopløsningsmidler. Forskellige testkemikalier vil dog have forskellige fysisk-kemiske egenskaber, der sandsynligvis vil kræve forskellige tilgange til fremstilling af vand til kemikalieeksponering. Det bør tilstræbes at undgå opløsningsmidler eller bærestoffer, fordi: (1) visse opløsningsmidler selv kan føre til toksicitet og/eller uønskede eller uventede reaktioner, (2) test af kemikalier over deres vandopløselighed (som det ofte sker ved brug af opløsningsmidler) kan resultere i unøjagtige bestemmelser af effektive koncentrationer, (3) brugen af opløsningsmidler i længerevarende test kan resultere i dannelse af en betydelig mængde biofilm som følge af mikrobiel aktivitet, som kan påvirke miljøforholdene og muligheden for at opretholde eksponeringskoncentrationer, og (4) i fravær af historiske data, der viser, at opløsningsmidlet ikke påvirker resultatet af undersøgelsen, kræver brugen af opløsningsmidler en behandling af kontrolkulturer med opløsningsmiddel, der har dyrevelfærdsmæssige konsekvenser, da der kræves flere dyr for at udføre testen. For kemikalier, som er vanskelige at teste, kan der anvendes et opløsningsmiddel som sidste udvej, og det beskrives i OECD's Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures (21), hvordan den bedste metode bestemmes. Valget af opløsningsmiddel afgøres af testkemikaliet's kemiske egenskaber og tilgængeligheden af historiske kontroldata om brugen af opløsningsmidlet. Foreligger der ikke historiske data, bestemmes opløsningsmidlets egnethed før gennemførelsen af den endelige undersøgelse. Hvis brug af et opløsningsmiddel er uundgåelig, og mikrobiologisk aktivitet (biofilmdannelse) forekommer, anbefales det, at biofilmdannelsen i de enkelte tanke registreres/rapporteres (mindst ugentligt) under hele testforløbet. Ideelt bør opløsningsmiddelkoncentrationen holdes konstant i kontrolkulturen med opløsningsmiddel og i alle testbehandlinger. Hvis koncentrationen af opløsningsmidlet ikke holdes konstant, bør den højeste koncentration af opløsningsmidlet i forsøgsbehandlingen anvendes i kontrolkulturen med opløsningsmiddel. I tilfælde, hvor der anvendes et opløsningsmiddelbærestof, bør de maksimale opløsningsmiddelkoncentrationer ikke overstige 100 µl/l eller 100 mg/l (21), og det anbefales, at opløsningsmiddelkoncentrationen holdes så lav som muligt (f.eks. ≤ 20 µl/l) for at undgå, at opløsningsmidlet potentielt påvirker de målte endepunkter (22).

Forsøgsdyr

Testarter

22. Testarten er *X. laevis*, fordi den: (1) den dyrkes rutinemæssigt i laboratorier over hele verden, (2) den kan let fås fra kommercielle leverandører, og (3) dens genetiske køn kan bestemmes.

Pasning af voksne og avl

23. Den hensigtsmæssige pasning og avl af *X. laevis* er beskrevet i standardretningslinjer (23). Hold og pasning af *X. laevis* er også beskrevet af Read (24). For at inducere yngleadfærd injiceres 3-5 par voksne hunner og hanner med humant choriongonadotropin (hCG). Hunner og hanner injiceres med henholdsvis ca. 800 IU-1 000 IU og 500 IU-800 IU hCG opløst i en 0,6-0,9 % saltvandsopløsning eller Ringers væske til frøer, en isotonisk saltopløsning til brug til amfibier; www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html). Den injicerede mængde bør være omkring 10 µl/g kropsvægt (~1 000 µl). Ynglende par holdes uforstyrrede og under statiske betingelser i store beholdere for at fremme amplexus. Bunden af hver ynglebeholder bør have en falsk bund af rustfrit stål eller plastvæv, så æggemasserne kan falde ned i beholderens bund. Frøer, som injiceres sidst på eftermiddagen, vil normalt lægge de fleste af deres æg midt på den følgende formiddag. Efter at en tilstrækkelig mængde æg er frigivet og befrugtet, fjernes de voksne dyr fra ynglebeholderne. Derefter indsamles æggene, og gelélaget fjernes ved hjælp af L-cysteinbehandling (23). Der fremstilles en 2 % L-cysteinopløsning, og pH justeres til 8,1 med 1 M NaOH. Denne 21 °C-opløsning tilføjes til en 500 ml Erlenmeyer kolbe indeholdende æggene fra en enkelt gydning og slynges forsigtigt rundt i et til to minutter, hvorefter der skylles grundigt 6-8 gange med 21 °C dyrkningsvand. Æggene overføres dernæst til en krystalliseringsskål og bestemmes til at være > 70 % levedygtige med minimale abnormaliteter på embryoner, der fremviser celledeling.

TESTDESIGN

Testkoncentrationer

24. Det anbefales, at der anvendes minimum fire kemiske koncentrationer og passende kontroller (herunder kontrolkulturer med opløsningsmiddel, hvis det er relevant). Generelt anbefales en koncentrationsadskillelse (afstandsfaktor), der ikke overstiger 3,2.
25. Med henblik på denne test anvendes resultaterne fra eksisterende amfibieundersøgelser til så vidt muligt at bestemme den højeste testkoncentration for at undgå koncentrationer, der er åbenlyst toksiske. Information fra f.eks. kvantitative relationer mellem struktur og aktivitet (QSAR), analogislutninger og data fra eksisterende amfibieundersøgelser såsom Amphibian Metamorphosis Assay, forsøgsmetode C.38 (25) og Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (23) og/eller fisketest såsom forsøgsmetoderne C.48, C.41 og C.49 (26) (27) (28) kan bidrage til fastsættelsen af denne koncentration. Forud for

gennemførelsen af LAGDA kan der gennemføres et forsøg til bestemmelse af dosisinterval. Det anbefales, at eksponeringen til bestemmelse af dosisinterval indledes inden for 24 timer efter befrugtningen og fortsættes i 7-14 dage (eller mere, hvis det er nødvendigt), og testkoncentrationerne fastsættes således, at intervallerne mellem testkoncentrationerne ikke er større end en faktor 10. Resultaterne af forsøget til bestemmelse af dosisinterval bør bruges til at fastsætte den højeste koncentration i LAGDA. Bemærk, at såfremt der er blevet anvendt et opløsningsmiddel, kan opløsningsmidlets egnethed (dvs. om det kan have en indvirkning på resultatet af undersøgelsen) bestemmes som en del af undersøgelsen til bestemmelse af dosisinterval.

Replikater inden for behandlingsgrupper og kontroller

26. Der bør anvendes minimum fire replikater pr. testkoncentration og minimum otte replikater til kontroller (og kontrolkultur med opløsningsmiddel, hvis det er relevant) (dvs. antallet af replikater i kontrollen og en eventuel kontrolkultur med opløsningsmiddel bør være dobbelt så højt som antallet af replikater i hver enkelt behandlingsgruppe for at sikre en tilstrækkelig statistisk styrke). Hvert replikat bør højst indeholde 20 dyr. Minimumsantallet af anvendte dyr er 15 (5 til NF stadium 62-delprøven og 10 unge individer). Der sættes dog ekstra dyr i hvert replikat for at tage hensyn til muligheden for dødelighed, således at det kritiske antal på 15 opretholdes.

FREMGANGSMÅDE

Oversigt over assayet

27. Assayet startes med nyligt gydede embryoner (NF stadium 8-10) og fortsætter indtil udviklingen af unge individer. Dyrene undersøges dagligt for dødelighed og eventuelle tegn på unormal adfærd. Ved NF stadium 62 indsamles en larvedelprøve (op til 5 dyr pr. replikat), og forskellige endepunkter undersøges (tabel 1). Når alle dyrene har nået NF stadium 66, dvs. afslutning af metamorfosen (eller efter 70 dage fra starten af assayet, hvad der måtte komme først), foretages der en vilkårlig udvælgelse (men uden delprøveudtagelse) for at nedbringe antallet af dyr (10 pr. beholder) (jf. punkt 43), og de resterende dyr eksponeres indtil 10 uger efter mediantiden til NF stadium 62 i kontrollen. Ved testens afslutning (udtagelse af prøver af unge individer) foretages der yderligere målinger (tabel 1).

Eksponeringsbetingelser

28. Et fuldstændigt sammendrag af testparametre findes i tillæg 3. Under eksponeringsperioden måles opløst ilt, temperatur og pH-værdien i testopløsningerne dagligt. Ledningsevne, alkalinitet og hårdhed måles en gang månedligt. Forskellene i vandtemperaturen i testopløsningerne mellem replikater og mellem behandlinger (på en

dag) bør ikke overstige 1,0 °C. Forskellene i testopløsningernes pH-værdi mellem replikater og mellem behandlinger bør ikke overstige 0,5.

29. Eksponeringsbeholderne kan suges rene dagligt for at fjerne uspist foder og affaldsprodukter, idet krydskontaminering af beholderne undgås. Det bør sikres, at stress og traumer for dyrene minimeres, især under flytning, rensning af akvarier og håndtering. Belastende betingelser/aktiviteter bør undgås, såsom høj og/eller uophørlig støj, bankning på akvariet, vibrationer i akvariet.

Varighed af eksponeringen for testkemikaliet

30. Eksponeringen indledes med nyligt gydede embryoner (NF stadium 8-10) og fortsættes indtil 10 uger efter mediantiden til NF stadium 62 (≤ 45 dage fra påbegyndelsen af assayet) i kontrolgruppen. Generelt er varigheden af LAGDA 16 uger (maksimalt 17 uger).

Indledning af assayet

31. Det skal på forhånd påvises, at de forældredyr, der anvendes til indledning af assayet, kan producere afkom, hvis genetiske køn kan bestemmes (tillæg 5). Efter gydning indsamles embryonerne, de cysteinbehandles for at fjerne gelélaget og screenes for levedygtighed (23). Cysteinbehandling gør det muligt at håndtere embryonerne under screeningen, uden at de klitrer til overflader. Screeningen foretages under et dissektionsmikroskop ved hjælp af en dråbepipette af passende størrelse til fjernelse af ikke levedygtige embryoner. Det foretrækkes, at en enkelt gydning, der resulterer i en levedygtighed på over 70 %, anvendes til testen. Embryoner ved NF stadium 8-10 fordeles vilkårligt i eksponeringsbehandlingsbeholdere indeholdende en passende mængde fortyndingsvand, indtil hver beholder indeholder 20 embryoner. Embryonerne håndteres forsigtigt under denne overførsel for at minimere håndteringsstress og undgå skader. 96 timer efter befrugtningen bør haletudserne have bevæget sig op i vandsøjlen og være begyndt at sætte sig fast på beholderens sider.

Fodring

32. Ændring af foder og fodring i de forskellige livsstadier for *X. laevis* er et meget vigtigt aspekt af LAGDA-protokollen. Overfodring på larvestadiet resulterer typisk i øget forekomst og mere alvorlige tilfælde af scoliose (tillæg 8) og bør undgås. Omvendt resulterer en utilstrækkelig fodring på larvestadiet i meget variable udviklingsrater blandt kontrollerne, hvilket potentielt kompromitterer den statistiske styrke eller konfunderer testresultaterne. Tillæg 4 indeholder anbefalinger om foder til og fodring af larver og unge individer af *X. laevis* under gennemstrømningsforhold, men alternativer er tilladt, forudsat at testorganismen vokser og udvikler sig tilfredsstillende. Det er vigtigt at bemærke, at foderet ikke må indeholde endokrinaktive stoffer såsom sojamel, såfremt der måles endokrinspecifikke endepunkter.

Larvefodring

33. Det anbefalede larvefoder består af ørredstartfoder, *Spirulina* algevafler og guldfiskefoder (f.eks. TetraFin® flakes, Tetra, Tyskland) blandet sammen i dyrkningsvand (eller fortyndingsvand). Blandingen gives tre gange dagligt på hverdage og en gang dagligt i weekender. Haletudserne fodres også med levende saltsøkrebs, *Artemia* spp., 24-timer gamle nauplii, to gange dagligt på hverdage og en gang dagligt i weekender begyndende på dag 8 efter befrugtningen. Larvefodringen, der bør være konsekvent i hver testbeholder, bør muliggøre en passende vækst og udvikling af forsøgsdyrene for at sikre reproducerbarhed og overførbare af assayresultaterne: (1) Mediantiden til NF stadium 62 i kontrollerne bør være ≤ 45 dage, og (2) en gennemsnitsvægt inden for $1,0 \pm 0,2$ g ved NF stadium 62 i kontrollerne anbefales.

Fodring af unge individer

34. Når metamorfosen er tilendebragt, består fodringen af synkende foder til frøer af høj kvalitet, f.eks. Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, USA) (tillæg 4). Til helt unge frøer males pillerne kortvarigt i en kaffekværn eller blender eller knuses i en morter for at gøre dem mindre. Når de unge frøer er store nok til at spise hele piller, er det ikke længere nødvendigt at male eller knuse dem. Dyrene bør fodres en gang dagligt. Fodringen af de unge frøer bør muliggøre en passende vækst og udvikling af organismene: Det anbefales, at unge frøer i kontrolgruppen har en gennemsnitsvægt på $11,5 \pm 3$ g ved afslutningen af assayet.

Analytisk kemi

35. Før assayet påbegyndes, bør testkemikaliets stabilitet (f.eks. opløselighed, nedbrydelighed og flygtighed) og alle analysemetoderne klarlægges, f.eks. ved hjælp af eksisterende information eller viden. Når doseringen foretages via fortyndingsvandet, anbefales det, at testopløsningerne fra hver enkelt replikatbeholderkoncentration analyseres før påbegyndelsen af testen for at efterprøve systemets effektivitet. I løbet af eksponeringsperioden bestemmes koncentrationerne af testkemikaliets med passende intervaller, helst en gang om ugen i mindst et replikat i hver behandlingsgruppe, idet der skiftes mellem replikaterne inden for den samme behandlingsgruppe hver uge. Det anbefales, at resultaterne baseres på målte koncentrationer. Hvis testkemikaliets koncentration i tilstrækkelig grad har holdt sig inden for ± 20 % af den nominelle koncentration under hele testen, kan resultaterne baseres på enten de nominelle eller de målte værdier. Variationskoefficienten (CV) for de målte testkoncentrationer under hele testforløbet i en behandling bør holdes på 20 % eller derunder i hver koncentration. Når de målte koncentrationer ikke ligger inden for 80-120 % af den nominelle koncentration (f.eks. når meget bionedbrydelige eller adsorptive kemikalier testes), bør

effektkoncentrationerne bestemmes og udtrykkes i forhold til den aritmetiske gennemsnitskoncentration for gennemstrømningstest.

36. Stamopløsningernes og fortyndingsvandets strømningshastigheder kontrolleres regelmæssigt (*f.eks.* tre gange ugentligt) under eksponeringen. Hvis kemikalier ikke kan påvises ved nogle eller alle de nominelle koncentrationer (*f.eks.* på grund af hurtig nedbrydning eller adsorption i testbeholderne eller ved en markant ophobning af kemikalier i de eksponerede dyr), anbefales det, at udskiftningen af testopløsningen i hvert kammer tilpasses for at holde testkoncentrationerne så konstante som muligt.

Observationer og endepunktsmålinger

37. De endepunkter, der evalueres under eksponeringen, er de endepunkter, der viser toksicitet, herunder dødelighed, unormal adfærd såsom kliniske sygdomstegn og/eller generel toksicitet, og vækstdeterminanter (længde og vægt) samt patologiske endepunkter, der kan reagere på både generel toksicitet og endokrine virkemåder, der påvirker østrogen-, androgen- eller skjoldbruskkirtelmedierede reaktionsveje. Derudover er det valgfrit, om man ønsker at måle VTG-koncentrationen i plasma ved afslutningen af assayet. Måling af VTG kan være nyttig for forståelsen af undersøgelsesresultaterne i forbindelse med de endokrine mekanismer for stoffer, der mistænkes for at være hormonforstyrrende. Endepunkter og timingen af målingerne er opstillet i tabel 1.

Tabel 1: Endepunktsoversigt for LAGDA

Endepunkter*	Dagligt	Mellemliggende prøvetagning (Larveprøvetagning)	Testafslutning (Prøveudtagning af unge individer)
Dødelighed og abnormiteter	X		
Tid til NF stadium 62		X	
Histo(pato)logi (skjoldbruskkirtlen)		X	
Morfometri (vægt- og længdetilvækst)		X	X
Lever-somatisk indeks (LSI)			X
Genetisk/fænotypisk kønsfordeling			X
Histopatologi (kønskirtler, ægge- og sædledere, nyrer og lever)			X
Vitellogenin (VTG) (valgfrit)			X

* Alle endepunkter analyseres statistisk.

Dødelighed og daglige observationer

38. Alle testbeholdere kontrolleres dagligt for døde dyr, og dødeligheden registreres for hver beholder. Døde dyr fjernes fra testbeholderen, så snart de observeres. De døde dyrs udviklingsstadium kategoriseres enten som præ-NF stadium 58 (præ-forlemmefremkomst), NF stadium 58-NF stadium 62, NF stadium 63-NF stadium 66 (mellem NF stadium 62 og fuldstændig haleabsorption), eller post-NF stadium 66 (post-larvestadium). En dødelighed på over 20 % kan tyde på uhensigtsmæssige testbetingelser eller åbenlyst toksiske virkninger af testkemikaliet. Dyrene har tendens til at være mest følsomme over for ikke-kemisk induceret dødelighed i de første dage af udviklingen efter gydningen og på højdepunktet af metamorfosen. En sådan dødelighed kan fremgå af kontrolldataene.
39. Derudover bør eventuelle observationer af unormal adfærd, grove misdannelser (*f.eks.* scoliose) eller skader registreres. Observationer af scoliose bør tælles (incidens) og inddeles efter alvorsgrad (*f.eks.* ikke markant – NR, minimal – 1, moderat – 2, alvorlig – 3; tillæg 8). Det bør tilstræbes, at prævalensen af moderat og alvorlig scoliose begrænses (*f.eks.* under 10 % i kontrollerne) under hele undersøgelsen, selv om en højere prævalens af abnormiteter i kontrolgruppen ikke nødvendigvis er en begrundelse for at indstille testen. Normal adfærd for larver er kendetegnet ved, at de hænger i vandsøjlen med halen hævet over hovedet, slår regelmæssigt og rytmisk med halefinnen, jævnligt kommer op til overfladen for at ånde og reagerer på stimuli. Abnorm adfærd omfatter *f.eks.* at flyde på overfladen, ligge på bunden af beholderen, omvendt eller uregelmæssig svømning, manglende overfladeaktivitet og manglende respons på stimuli. For dyr i post-metamorfosestadiet skal der ud over ovennævnte abnorme adfærd registreres forskelle i foderindtaget mellem behandlinger. Grove misdannelser og læsioner kan omfatte morfologiske abnormiteter (*f.eks.* misdannelse af lemmer), hæmoragiske læsioner, ødemer på maven, bakterie- eller svampeinfektioner for blot at nævne nogle få. Forekomsten af skader på hovedet af unge individer, lige bag ved næseborene kan være et tegn på utilstrækkelig fugtighed. Disse bestemmelser er kvalitative og anses for at svare til kliniske tegn på sygdom/stress og foretages ved sammenligning med kontroldyr. Hvis forekomsten er større i eksponerede beholdere end i kontrollerne, betragtes disse som bevis for åbenlys toksicitet.

Delprøvetagning af larver

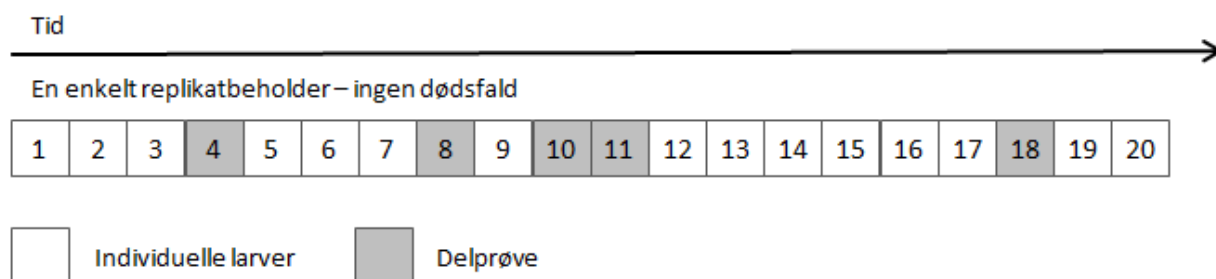
Oversigt over delprøvetagning af larver:

40. Haletudser, der har nået NF stadium 62, bør fjernes fra beholderne og enten udtages til prøve eller flyttes til den næste del af eksponeringen i en ny beholder, eller fysisk adskilles fra de resterende haletudser i samme tank med en deleanordning. Haletudserne kontrolleres dagligt, og den undersøgelsesdag, hvor de enkelte haletudser når NF stadium 62, registreres. Det bestemmende kendetegn, der bruges i denne vurdering, er hovedets form. Når hovedet er blevet så meget mindre, at det visuelt har omtrent samme bredde som

haletudsens krop, og forlemmerne befinder sig midt ud for hjertet, anses det pågældende individ for at have nået NF stadium 62.

41. Målet er at udtage en prøve på i alt fem haletudser i NF stadium 62 pr. replikatbeholder. Dette bør ske fuldstændig tilfældigt, men bestemmes *på forhånd*. Et hypotetisk eksempel på en replikatbeholder findes i **figur 1**. Hvis der er 20 overlevende haletudser i en beholder, når det første individ når NF stadium 62, udvælges fem tilfældige haletudser blandt nr. 1-20. Haletudse nr. 1 er det første individ, der når NF stadium 62, og haletudse nr. 20 er det sidste individ i beholderen, der når NF stadium 62. Hvis der er 18 overlevende larver i en beholder, bør de fem tilfældige larver ligeledes udvælges blandt nr. 1-18. Denne handling bør udføres for hver replikatbeholder, når det første individ når NF stadium 62. Hvis der er dødelighed ved NF stadium 62-prøvetagningen, skal de resterende prøver genrandomiseres på grundlag af det resterende antal larver < NF stadium 62 og det antal prøver, der er nødvendigt for at nå op på i alt fem prøver fra det pågældende replikat. Den dag, en haletudse når NF stadium 62, sammenlignes med det på forhånd udarbejdede skema for at bestemme, om det pågældende individ skal udtages til prøve eller fysisk adskilles fra de resterende haletudser med henblik på fortsat eksponering. I det angivne eksempel (figur 1) adskilles det individ, der først når NF stadium 62 (dvs. boks nr. 1) fysisk fra de øvrige larver, eksponeringen fortsættes, og den undersøgelsesdag, hvor det pågældende individ nåede NF stadium 62, registreres. Efterfølgende behandles individ nr. 2 og nr. 3 på samme måde som individ nr. 1, hvorefter individ nr. 4 udtages til prøve for vækst og histologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtlen (i henhold til dette eksempel). Denne procedure fortsættes indtil det 20. individ enten flyttes over til de resterende post-NF stadium 62 individer eller udtages til prøve. Den randomiserede procedure, der anvendes, bør give alle organismer i testen den samme sandsynlighed for at blive udvalgt. Dette kan nås ved at anvende enhver randomiserende metode, men det kræver også, at hver enkelt haletudse fanges i net på et eller andet tidspunkt i NF stadium 62-delprøvetagningsperioden.

Figur 1: Hypotetisk eksempel på en NF stadium 62-prøvetagningsplan for en enkelt replikatbeholder.



42. De endepunkter, der opnås ved larvedelprøvetagningen er: (1) tid til NF stadium 62 (dvs. antal dage mellem befrugtning og NF stadium 62), (2) eksterne abnormiteter, (3) morfometri (*f.eks.* vægt og længde) og (4) histologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtlen.

Human aflivning af haletudser

43. Delprøven af haletudser i NF stadium 62 (5 individer pr. replikat) aflives ved at nedsænke dem i 30 min. i en passende mængde (*f.eks.* 500 ml) anæstesiopløsning (*f.eks.* 0,3 % opløsning af MS-222, tricainmethansulfonat, CAS.886-86-2). MS-222 bør være bufret med natriumbicarbonat, til en pH-værdi på omkring 7,0, fordi en ubufret MS-222-opløsning er sur og irriterer frøhud, hvilket resulterer i en dårlig absorption og unødvendig ekstra stress for organismerne.
44. Ved hjælp af en lille ketsjer fjernes en haletudse fra forsøgskammeret og transporteres til (anbringes i) anæstesiopløsningen. Dyret er aflivet korrekt og parat til obduktion, når det ikke længere reagerer på eksterne stimuli som *f.eks.* knibning i bagbenet med en pincet.

Morfometri (vægt- og længdetilvækst)

45. Måling af vådvægt (nærmeste mg) og længde fra snude til kloakåbning (SVL) (nærmeste 0,1 mm) for hver enkelt haletudse bør foretages straks efter, at den ikke længere reagerer efter anæstesi (figur 2a). Billedanalysesoftware kan anvendes til at måle SVL ud fra et billede. Haletudserne duppes tørre før vejning for at fjerne overskydende vand. Efter målinger af størrelse (vægt og SVL) registreres eller noteres eventuelle alvorlige morfologiske abnormiteter og/eller kliniske tegn på toksicitet såsom scoliose (se tillæg 8), pettekie og blødning, og det anbefales, at der foretages digital dokumentation. Pettekie er små røde eller lilla blødninger i hudkapillærerne.

Indsamling af væv og fiksering

46. I larvedelprøven foretages en histologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtlen. Den nedre del af torsoen bag forlemmerne fjernes og kasseres. Det trimmede kadaver fikseres i Davidson's fikseringsmiddel. Mængden af fikseringsmiddel i beholderen bør være mindst ti gange det anslåede volumen af vævene. Fikseringsvæsken bør omrystes eller cirkuleres ordentligt for at sikre en korrekt fiksering af det pågældende væv. Alle væv ligger i Davidson's fikseringsmiddel i mindst 48 timer, men ikke længere end 96 timer, hvorefter de skylles i demineraliseret vand og opbevares i 10 % neutral bufret formalin (1) (29).

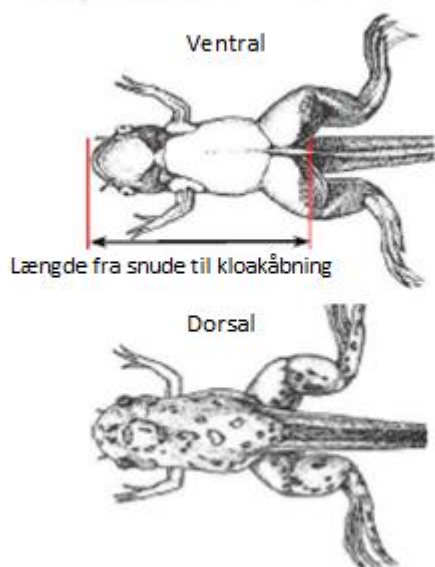
Histologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtlen

47. For hver enkelt larvedelprøve (fikseret væv) foretages en histologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtlen, dvs. diagnosticering og inddeling efter alvorsgrad (29) (30).

Figur 2: Kendetegn for måling af længde fra snude til kloakåbning i LAGDA i NF stadium 62 (a) og unge frøer (b). De definerende kendetegn ved NF stadium 62 (a): Hovedet har samme bredde som kroppen,

lugtenerven er kortere end diameteren af bulbus olfactorius (set fra ryggen), og forlemmerne befinder sig på niveau med hjertet (set fra bugen). Billeder tilpasset fra Nieuwkoop og Faber (1994).

a. Delprøvetagning af larver (NF etape 62)



b. Prøvetagning af unge individer



Afslutning af larveeksponeringen

48. På grund af det oprindelige antal haletudser forventes det, at der sandsynligvis vil være en lille procentdel af individerne, der ikke udvikler sig normalt, og som ikke fuldfører metamorfosen (NF stadium 66) inden for en rimelig tid. Larveandelen af eksponeringen bør ikke overstige 70 dage. Haletudser, der måtte være tilbage ved udløbet af denne periode, aflives (jf. punkt 43), deres vådvægt og SVL måles, de inddeles i henhold til Nieuwkoop og Faber, 1994, og eventuelle udviklingsmæssige abnormiteter noteres.

Udvælgelse efter NF stadium 66

49. Ti individer pr. beholder bør fortsætte fra NF stadium 66 (fuldstændig haleresorption), indtil eksponeringen afsluttes. Derfor bør der, når dyrene har nået NF stadium 66 eller efter 70 dage (hvad der måtte komme først), foretages en udvælgelse. De dyr i post NF stadium 66, der ikke skal fortsætte eksponeringen, udvælges vilkårligt.
50. De dyr, der ikke udvælges til fortsat eksponering, aflives (jf. punkt 43). Der foretages målinger af udviklingsstadiet, vådvægt og SVL (figur 2b) på hvert enkelt dyr, ligesom der foretages en makroskopisk undersøgelse. Fænotypisk køn (baseret på kønskirtelmorfologi) noteres som hun, han eller ubestemmelig.

Prøveudtagning af unge individer

Oversigt over prøveudtagning af unge individer

51. De resterende dyr eksponeres fortsat frem til 10 uger efter mediantiden til NF stadium 62 i fortyndingsvandkontrollen (og/eller opløsningsmiddelkontrollen, hvis det er relevant). Ved eksponeringsperiodens udløb aflives de resterende dyr (maksimum 10 frøer pr. replikat), og de forskellige endepunkter måles eller evalueres og registreres: (1) morfometri (vægt og længde), (2) kønsfordelingen mellem fænotype/genotype, (3) levervægt (lever-somatisk indeks), (4) histopatologi (kønskirtler, ægge- og sædledere, lever og nyrer) og eventuelt (5) plasma VTG.

Human aflivning af frøer

52. De unge individer, der befinder sig på stadiet efter afslutning af metamorfosen, aflives med en intraperitoneal injektion af bedøvelsesmiddel, *f.eks.* 10 % MS-222 i en passende fosfatbufret opløsning. Frøerne kan udtages til prøve, når de ikke længere reagerer (normalt omkring 2 minutter efter injektion, hvis der anvendes 10 % MS-222 i en dosis på 0,01 ml pr. g frø). Selv om de unge frøer kunne nedsænkes i en højere koncentration af bedøvelsesmiddel (MS-222), har erfaringen vist, at det varer længere, inden de bliver bedøvet med denne metode, og varigheden muliggør måske ikke prøveudtagning. Injektion medfører en effektiv og hurtig aflivning forud for prøveudtagning. Prøveudtagningen bør ikke indledes, før det er blevet fastslået, at frøerne ikke længere reagerer, for at sikre, at dyrene er døde. Hvis frøerne viser tegn på, at de lider meget (virkelig meget, og det med pålidelighed kan forudsiges, at de vil dø), og betragtes som døende, skal de bedøves og aflives og behandles som dødelighed i forbindelse med dataanalysen. Når en frø aflives på grund af dødelighed, skal det noteres og rapporteres. Afhængigt af, hvornår frøen aflives i løbet af undersøgelsen, kan den opbevares med henblik på histopatologiske analyser (fiksering af frøen med henblik på eventuel histopatologi).

Morfometri (vægt- og længdetilvækst)

53. Målingerne af vådvægt og SVL (figur 2b) svarer til de målinger, der er opstillet for larvedelprøver.

Plasma VTG (valgfrit)

54. VTG er en bredt anerkendt biomarkør, der er et resultat af eksponering for østrogene kemikalier. I LAGDA kan plasma VTG eventuelt måles i unge individer (dette kan navnlig være relevant, hvis kemikaliet mistænkes for at være et østrogen).
55. Bagbenene skæres af de aflivede unge individer, og blod opsamles ved hjælp af et hepariniseret kapillærrør (selv om alternative metoder til indsamling af blod som *f.eks.* hjertepunktur kan være egnede). Blodet overføres til et mikrocentrifugeringsrør (*f.eks.* et volumen på 1,5 ml) og centrifugeres for at opnå plasma. Plasmaprøverne opbevares ved -70 °C eller derunder, indtil bestemmelsen af VTG foretages. Koncentrationen af plasma

VTG kan måles ved hjælp af enzymkoblet immunadsorptionsteknik (ELISA) (tillæg 6), eller ved hjælp af en alternativ metode som f.eks. massespektrometri (31). Artsspecifikke antistoffer foretrækkes på grund af større følsomhed.

Genetisk kønsbestemmelse

56. Hver enkelt ung frøs genetiske køn bestemmes på grundlag af de markører, der er udviklet af Yoshimoto *et al.* (11). Med henblik på bestemmelse af det genetiske køn indsamles en del af (eller hele) bagbenet (eller andet væv), der blev fjernet under dissekeringen og lagres i et mikrocentrifugeringsrør (vævsprøver fra frøer kan tages af alt væv). Væv kan lagres ved -20 °C eller derunder, indtil deoxyribonukleinsyre (DNA) isoleres. Isolering af DNA fra væv kan foretages med kommercielt tilgængelige kits, og analysen af tilstedeværelse eller fravær af markøren foretages ved hjælp af polymerasekædereaktionsmetoden (tillæg 5). Generelt er overensstemmelsen mellem histologisk bestemt køn og genotype i kontroldyrene ved prøvetagningstidspunktet for unge individer i kontrolgrupperne over 95 %.

Indsamling af væv og fiksering til histopatologi

57. Kønskirtler, ægge- og sædledere, nyrer og leverer indsamles til histologisk analyse under den endelige prøvetagning. Bughulen åbnes, og leveren udtages og vejes. Dernæst fjernes fordøjelsesorganerne (*f.eks.* mave, tarme) omhyggeligt fra den lavere del af bughulen for at blottlægge kønskirtlerne, nyrerne og ægge- og sædlederne. Synlige morfologiske abnormiteter i kønskirtlerne registreres. Endelig fjernes bagbenene, hvis de ikke allerede er blevet fjernet med henblik på opsamling af blod. De indsamlede leverer og kadavere med kønskirtlerne *in situ* anbringes straks i Davidson's fikseringsmiddel. Mængden af fikseringsmiddel i beholderen bør være mindst ti gange det anslåede volumen af vævene. Alle væv ligger i Davidson's fikseringsmiddel i mindst 48 timer, men ikke længere end 96 timer, hvorefter de skylles i demineraliseret vand og opbevares i 10 % neutral bufret formalin (1) (29).

Histopatologi

58. Hver prøve af en ung frø evalueres histologisk for sygdom i kønskirtlerne, ægge- og sædlederne, nyre- og levervæv, dvs. diagnosticering og inddeling efter alvorsgrad (32). Kønskirtelfænotypen udledes også af denne evaluering (*f.eks.* ovarier, testis, interkøn), og sammen med de individuelle målinger af genetisk køn kan disse observationer anvendes til at beregne fænotype/genotype-kønsfordelingen.

DATARAPPORTERING

Statistisk analyse

59. LAGDA genererer tre former for data, der kan analyseres statistisk: (1) kvantitative kontinuerlige data (vægt, SVL, LSI, VTG), (2) tid til hændelse-data for udviklingsraterne (dvs. dage til NF stadium 62 fra påbegyndelsen af assayet) og (3) ordinaldata i form af alvorsgrad eller udviklingsstadier fra histopatologiske evalueringer.
60. Det anbefales, at testdesignet og valget af statistisk test har tilstrækkelig styrke til at påvise ændringer af biologisk betydning i endepunkter, hvor der skal registreres en NOEC- eller ECx-værdi. Statistiske analyser af data (generelt på grundlag af replikatgennemsnit) bør helst følge de procedurer, der er beskrevet i dokumentet *Current Approaches in Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (33). Tillæg 7 til denne forsøgsmetode indeholder det anbefalede beslutningstræ for statistisk analyse og vejledning i behandling af data og i valg af den mest velegnede statistiske test eller model, der skal anvendes i LAGDA.
61. Dataene fra prøveudtagning af unge frøer (f.eks. vækst, LSI) bør analyseres separat for genotypisk køn, da det genotypiske køn bestemmes for alle frøer.

Dataanalyseovervejelser

Brug af kompromitterede replikater og behandlinger

62. Replikater og behandlinger kan kompromitteres på grund af for høj dødelighed som følge af åbenlys toksicitet, sygdom eller tekniske fejl. Hvis en behandling kompromitteres på grund af sygdom eller tekniske fejl, bør der være tre ukompromitterede behandlinger med tre ukompromitterede replikater, som kan analyseres. Hvis åbenlys toksicitet forekommer ved høje behandlinger, foretrækkes det, at mindst tre behandlingsniveauer med tre ukompromitterede replikater kan analyseres (stemmer overens med Maximum Tolerated Concentration tilgangen i OECD-testvejledninger (34)). Ud over dødelighed kan tegn på åbenlys toksicitet omfatte adfærdsmæssige virkninger (f.eks. at dyrene flyder på overfladen, ligger på bunden af beholderen, omvendt eller uregelmæssig svømning, manglende overfladeaktivitet), morfologiske skader (f.eks. hæmoragiske skader, ødemer på maven) eller unormalt fødeindtag, når der foretages en kvalitativ sammenligning med kontroldyrene.

Opløsningsmiddelkontrol

63. Ved afslutning af testen foretages der en evaluering af opløsningsmidlets potentielle virkninger (hvis et sådant anvendes). Dette sker ved en statistisk sammenligning af gruppen af kontrolkulturer med opløsningsmiddel og gruppen af kontrolkulturer med fortyndingsvand. De mest relevante endepunkter, der skal tages i betragtning i forbindelse med denne analyse, er vækstdeterminanterne (vægt og længde), da disse kan påvirkes af generel toksicitet. Hvis der påvises statistisk signifikante forskelle i disse endepunkter mellem gruppen af kontrolkulturer med fortyndingsvand og gruppen af kontrolkulturer

med opløsningsmiddel, bør den bedste faglige vurdering anvendes til at bestemme, om gyldigheden af testen er kompromitteret. Hvis de to kontroller afviger fra hinanden, bør de behandlinger, der er eksponeret for kemikaliet, sammenlignes med gruppen af kontrolkulturer med opløsningsmiddel, medmindre det er velkendt, at sammenligning med gruppen af kontrolkulturer med fortyndingsvand foretrækkes. Hvis der ikke findes nogen statistisk signifikant forskel mellem de to kontrolgrupper, anbefales det, at de behandlinger, der er eksponeret for testkemikaliet, sammenlignes med de samlede grupper (opløsningsmiddel- og fortyndingsvandkontrolgrupper), medmindre det er velkendt, at sammenligning med fortyndingsvandkontrolgruppen eller opløsningsmiddelkontrolgruppen foretrækkes.

Testrapport

64. Testrapporten skal indeholde følgende:

Testkemikalie:

- Fysisk form og, hvor det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber
- Stof med kun én bestanddel:
 - fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber
 - kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt, osv. (herunder evt. organisk kulstofindhold).
- Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:
 - så vidt muligt kendetegnet ved kemisk identitet (jf. ovenfor), kvantitativ forekomst og bestanddelenes relevante fysisk-kemiske egenskaber.

Testarter:

- Videnskabeligt navn, stamme, hvis oplysninger herom foreligger, kilde og metode til indsamling af befrugtede æg og den efterfølgende håndtering af dem.
- Forekomsten af scoliose i historiske kontroller for den anvendte stamkultur.

Testbetingelser:

- Lysperiode(r)
- Testdesign (f.eks. testkamrenes størrelse, materiale og vandmængde, antal testkamre og replikater, antal testorganismer pr. replikat)
- Fremstillingsmetode til stamopløsning og hyppighed af udskiftning (hvis der er anvendt opløsningsmiddel, bør dets koncentration anføres)

- Metode til dosering af testkemikaliets (f.eks. pumper, fortyndingssystemer)
- Metodens genfindingsgrad og de nominelle testkoncentrationer, grænsen for kvantitativ bestemmelse, gennemsnittet af de målte værdier og deres standardafvigelser i testbeholderne og den metode, hvorved de er opnået, samt dokumentation for, at målingerne refererer til testkemikaliets faktiske koncentration i en egentlig opløsning
- Fortyndingsvandets karakteristika: pH, hårdhedsgrad, temperatur, koncentration af opløst ilt, restchlorniveau (hvis målt), iodid i alt, total organisk kulstof (hvis målt), opslæmmede substanser (hvis målt), saltindhold i testmediet (hvis målt) og alle andre målinger, der er foretaget
- de nominelle testkoncentrationer, de målte middelværdier og deres standardafvigelser
- vandkvalitet i testbeholderne, pH, temperatur (dagligt) og koncentration af opløst ilt
- Detaljerede oplysninger om fodring (f.eks. fodertype, -kilde, -mængde og fodringshyppighed).

Resultater:

- Dokumentation for, at kontrollerne opfyldte validitetskriterierne
- Data for kontrol- (og opløsningsmiddelkontrol, når der anvendes opløsningsmiddel) og behandlingsgrupper som følger: dødelighed og observeret abnormitet, tid til NF stadium 62, histologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtlen (kun larveprøven), vækst (vægt og længde), LSI (kun prøven af helt unge frøer), genetisk/fænotypisk kønsfordeling (kun prøven af unge frøer), histopatologiske undersøgelsesresultater for kønskirtler, ægge- og sædledere, nyrer og lever (kun prøven af unge frøer) og plasma VTG (kun prøven af unge frøer, valgfri)
- Statistisk analysemetode og behandling af data (anvendt statistisk test eller model)
- koncentration uden observeret effekt (NOEC) ved hver måling
- Laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) ved hver måling (ved $\alpha = 0,05$). EC_x for hver måling, hvis det er relevant, og konfidensintervaller (f.eks. 95 %) og en graf med den fittede model, der blev brugt til beregningen, koncentration/respons-kurvens hældning, regressionsmodellens formel, de estimerede modelparametre og deres standardafvigelse.
- Eventuelle afvigelser fra forsøgsmetoden og afvigelser fra acceptkriterierne samt overvejelser vedrørende de potentielle konsekvenser for resultaterne af testen.

65. I forbindelse med resultaterne af endepunktmålingerne bør gennemsnitsværdierne og deres standardafvigelser (om muligt for såvel replikat som koncentration) præsenteres.

66. Mediantid til NF stadium 62 i kontrolgrupperne bør beregnes og præsenteres som gennemsnittet af replikatmedianerne og deres standardafvigelse. For behandlinger beregnes ligeledes en medianbehandling, der præsenteres som gennemsnittet af replikatmedianerne og deres standardafvigelse.

LITTERATUR

- (1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.
- (2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) Nieuwkoop PD og Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.
- (4) Kloas W og Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 16-27.
- (5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140-144.
- (6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.
- (7) Villalpando I og Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281-285.
- (8) Miyata S, Koike S og Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.
- (9) Mikamo K og Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.
- (10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K og Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143-150.
- (11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T og Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

- (12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S og Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.
- (13) Tobias ML, Tomasson J og Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441-448.
- (14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR og Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321-327.
- (15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A og Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159-169.
- (16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.
- (17) Kapitel C.4 i dette bilag, Bestemmelse af let bionedbrydelighed.
- (18) Kapitel C.29 i dette bilag Let bionedbrydelighed - CO₂ i lukkede beholdere (Headspace-test).
- (19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL og Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539-551.
- (20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593-9.
- (21) OECD draft (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ og Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69-92.

- (23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.
- (24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., s. 84 ff.
- (25) Kapitel C.38 i dette bilag, Amphibian Metamorphosis Assay (Assay for amfibiemetamorfose).
- (26) Kapitel C.48 i dette bilag, Assay for fisks reproduktion på kort sigt.
- (27) Kapitel C.41 i dette bilag, Test af fisks kønsudvikling.
- (28) Kapitel C.49 i dette bilag, Test af akut toksicitet for fiskeembryoner (FET).
- (29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC og Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.
- (31) Luna LG og Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.
- (32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

Tillæg 1

DEFINITIONER

Apikalt endepunkt: forårsager en virkning på populationsniveau.

Kemikalie: et stof eller en blanding.

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (enzymkoblet immunadsorptionsassay).

EC_x: (effektkoncentration for x % virkning) er den koncentration, der har en virkning på x % på testorganismer inden for en given eksponeringsperiode sammenlignet med en kontrol. F.eks. er EC₅₀ en koncentration, der skønnes at have en virkning på testens endepunkt hos 50 % af en eksponeret population i en fastlagt eksponeringsperiode.

Dpf: dage efter befrugtning.

Gennemstrømningstest: en test med en stadig strøm af testopløsninger gennem testsystemet under hele eksponeringen.

HPG-akse: hypothalamus-hypofyse-gonadeakse.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.

Laveste koncentration med observeret effekt (LOEC): den laveste koncentration af et testkemikalie, som i testen har vist sig at have en statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$) sammenlignet med kontrollen. Imidlertid skal alle undersøgte koncentrationer, der ligger over LOEC, have haft en skadelig virkning, som er større end eller lig med den, der er observeret ved LOEC. Er disse to betingelser ikke opfyldt, bør der fyldestgørende redegøres for, hvordan den pågældende LOEC (og dermed NOEC) er valgt. Der findes en vejledning i tillæg 7.

Middel letal koncentration (LC₅₀): den koncentration af testkemikaliets, som skønnes at være dødelig for 50 % af testorganismerne i løbet af testens varighed.

Koncentration uden observeret effekt (NOEC): den testkoncentration umiddelbart under LOEC, som ved sammenligning med kontrollen ikke har nogen statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$) inden for en given eksponeringstid

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

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

UVCB: stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer.

VTG: vitellogenin er en phospholipid-glycoprotein-prækursor for æggeblommeprotein, der normalt forekommer hos seksuelt aktive hunner af alle æglæggende arter.

Tillæg 2**NOGLE KEMISKE EGENSKABER FOR ACCEPTABELT FORTYNDINGSVAND**

Stof	Koncentrationsgrænse
Partikler	5 mg/l
Organisk kulstof i alt	2 mg/l
Ikke-ioniseret ammoniak	1 µg/l
Restchlor	10 µg/l
Organophosphorpesticider i alt	50 ng/l
Chlorerede organiske pesticider + polychlorbiphenyler i alt	50 ng/l
Organisk chlor i alt	25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Kobolt	1 µg/l
Kobber	1 µg/l
Jern	1 µg/l
bly	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Zink	1 µg/l
Cadmium	100 ng/l
Kviksølv	100 ng/l
Sølv	100 ng/l

Tillæg 3**TESTBETINGELSER FOR LAGDA**

1. Testarter	<i>Xenopus laevis</i>
2. Testtype	Gennemstrømningstest
3. Vandtemperatur	Den nominelle temperatur er 21 °C. Middeltemperaturen under hele testforløbet er ± 1 °C (forskellene mellem replikater og mellem behandlinger bør ikke overstige 1,0 °C).
4. Belysningskvalitet	Fluorescerende pærer (bredspektrede) 600-2 000 lux (lumen/m ²) ved vandoverfladen
5. Lysperiode	12 t. lys, 12 t. mørke
6. Volumen af testopløsning og testbeholder (tank)	4-10 l (minimum 10-15 cm vanddybde) Beholder af glas eller rustfrit stål
7. Volumenudskiftning af testopløsninger	Konstant i forhold til både opretholdelsen af biologiske vilkår og kemisk eksponering (f.eks. 5 volumenudskiftninger om dagen)
8. Testorganismernes alder ved start	Nieuwkoop og Faber (NF) stadium 8-10
9. Antal organismer pr. replikat	20 dyr (embryoner)/beholder (replikat) ved eksponeringens start, og 10 dyr (unge individer)/beholder efter NF stadium 66 til afslutningen af eksponeringen
10. Antal behandlinger	Minimum 4 testkemikaliebehandlinger plus passende kontrol(ler)
11. Antal replikater pr. behandling	4 replikater pr. behandling for testkemikaliet og 8 replikater for kontrol(ler)
12. Antal organismer pr. testkoncentration	Minimum 80 dyr pr. behandling for testkemikaliet og minimum 160 replikater for kontrol(ler)
13. Fortyndingsvand	Alt vand, der tillader en normal vækst og udvikling af <i>X. laevis</i> (f.eks. kildevand eller trækulsfiltreret ledningsvand)
14. Beluftning	Ikke påkrævet, men beluftning af beholderne kan være nødvendig, hvis niveauerne af opløst ilt falder under de anbefalede grænser, og stigningerne i flowet af testopløsning når op på maksimumsgrænsen.
15. Opløst ilt i testopløsningen	Opløst ilt: ≥ 40 % af luftmætningsværdien eller $\geq 3,5$ mg/l
16. pH i testopløsningen	6,5-8,5 (forskellene mellem replikater/behandlinger må ikke overstige

	0,5)
17. Testopløsningens hårdhed og alkalinitet	10-250 mg CaCO ₃ /l
18. Fodring	(Se tillæg 4)
19. Eksponeringsperiode	Fra NF stadium 8-10 til ti uger efter middeltiden til NF stadium 62 i vand- og/eller opløsningsmiddelkontrolgruppen (maksimum 17 uger)
20. Biologiske endepunkter	Dødelighed (og observeret abnormitet), tid til NF stadium 62 (larveprøve), histologisk undersøgelse af skjoldbruskkirtlen (larveprøve), vækst (vægt og længde), lever-somatisk indeks (prøve af unge frøer), genetisk/fænotypisk kønsfordeling (prøve af unge frøer), histopatologisk undersøgelse af kønskirtler, ægge- og sædledere, nyrer og lever (prøve af unge frøer) og plasma vitellogenin (prøve af unge frøer, valgfri)
21. Valideringskriterier for testen	Opløst ilt bør være > 40 % af luftmætningsværdien; middelvandtemperaturen bør være 21 ± 1 °C, og forskellene mellem replikater og mellem behandlinger bør være < 1,0 °C; testopløsningens pH-værdi bør ligge på mellem 6,5 og 8,5; dødeligheden i kontrolgruppen bør være ≤ 20 % i hver replikat, og middeltiden til NF stadium 62 bør være ≤ 45 dage; testorganismernes gennemsnitsvægt ved NF stadium 62 og ved afslutningen af assayet i kontrollerne og i opløsningsmiddelkontrollerne (hvis relevant) skal nå op på henholdsvis $1,0 \pm 0,2$ og $11,5 \pm 3$ g; der skal være dokumentation for, at koncentrationerne af testkemikaliet i opløsning på tilfredsstillende måde er holdt inden for ± 20 % af gennemsnittet af de målte værdier.

Tillæg 4

FODRING

Det bemærkes, at selv om denne fodring anbefales, er alternativer tilladt, forudsat at testorganismerne vokser og udvikler sig tilfredsstillende.

Larvefodring

Fremstilling af larvefoder

- A. 1:1 (v/v) ørredstartfoder: alge/TetraFin® (eller tilsvarende)
1. Ørredstartfoder: Blend 50 g ørredstartfoder (fint granulat eller pulver) og 300 ml egnet filtreret vand ved højeste blenderhastighed i 20 sekunder.
 2. Alge/TetraFin® (eller tilsvarende) blanding: Blend 12 g spirulina-algevafler og 500 ml filtreret vand ved høj hastighed i 40 sekunder, blend 12 g Tetrafin® (eller tilsvarende) med 500 ml filtreret vand, og bland derefter de to dele til 1 l 12 g/l spirulinaalger og 12 g/l Tetrafin®(eller tilsvarende).
 3. Bland lige dele blendet ørredstartfoder og alge/TetraFin®(eller tilsvarende) blanding.

B. Saltsøkrebs:

15 ml saltsøkrebsæg klækkes i 1 l saltvand (fremstillet ved at tilsætte 20 ml NaCl til 1 l demineraliseret vand). Efter beluftning i 24 timer ved rumtemperatur under konstant lys høstes saltsøkrebsene. Saltsøkrebsene får lov til at bundfælde i 30 min. ved, at beluftningen stoppes. Blærer, der flyder op i toppen af beholderen, hældes fra og kasseres, og saltsøkrebsene hældes igennem et passende filter og fortyndes op til 30 ml med filtreret vand.

Fodringsprotokol

Tabel 1 indeholder en oversigt over den type og mængde foder, der anvendes på larvestadiet af eksponeringen. Dyrene fodres tre gange om dagen mandag til fredag og en gang om dagen i weekender.

Tabel 1: Fodring af *X. laevis* larver i gennemstrømningstest

Tid* (efter befrugtning)	Ørredstartfoder: alger/TetraFin® (eller tilsvarende)		Saltsøkrebs	
	Hverdag (tre gange om dagen)	Weekend (en gang om dagen)	Hverdag (to gange om dagen)	Weekend (en gang om dagen)
Dag 4-14 (i uge 0-1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (fra dag 8 til 15)	0,5 ml (fra dag 8 til 15)
Uge 2	0,67 ml	2,4 ml	1 ml (fra dag 16)	1 ml (fra dag 16)
Uge 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml

Uge 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Uge 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
Uge 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Uge 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Uge 8-10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

* Dag 0 defineres som den dag, hvor injektionen med hCG foretages.

Foderomlægning fra larve til ung frø

Efterhånden som larverne fuldfører metamorfosen, går de over til den nedenfor beskrevne fodersammensætning for unge frøer. Under denne overgang bør der skæres ned på larvefoderet, mens foderet til unge frøer øges. Det kan ske ved at reducere larvefoderet proportionalt, mens foderet til unge frøer øges proportionalt, efterhånden som hver gruppe på fem haletudser passerer NF stadium 62 og nærmer sig afslutningen af metamorfosen ved NF stadium 66.

Fodring af unge individer

Foder til unge frøer

Når metamorfosen er fuldført (stadium 66), ændres foderplanen til 3/32 inch synkende foder til frøer af høj kvalitet alene (Xenopus Express™, FL, USA) eller tilsvarende.

Fremstilling af knuste piller til overgangen fra larver til unge frøer

Pillerne males kortvarigt i en kaffekværn eller blender eller knuses i en morter for at gøre dem ca. en tredjedel mindre. En for langvarig forarbejdning resulterer i pulver, som kasseres.

Fodringsprotokol

Tabel 2 indeholder en oversigt over den type og mængde foder, der anvendes til unge frøer og frøer på voksenstadiet. Dyrene bør fodres en gang dagligt. Det bemærkes, at efterhånden som dyrene gennemgår metamorfosen, fodres de fortsat med saltsøkrebs, indtil > 95 % af dyrene har fuldført metamorfosen.

Dyrene fodres ikke på den dag, hvor testen afsluttes, så foder ikke påvirker vægtmålingerne.

Tabel 2: Fodring af unge *X. laevis*-frøer i gennemstrømningstest. Det bemærkes, at dyr, der ikke har gennemgået metamorfosen, herunder de dyr, hvis metamorfose er blevet forsinket af den kemiske behandling, ikke kan spise piller, der ikke er knust.

Tid	Mængde knuste piller	Mængde hele piller
-----	----------------------	--------------------

(Uger efter mediandatoen for metamorfose)	(mg pr. ung frø)	(mg pr. ung frø)
Efterhånden som dyrene fuldfører metamorfosen	25	0
Uge 0-1	25	28
Uge 2-3	0	110
Uge 4-5	0	165
Uge 6-9	0	220

* Den første dag i uge 0 er medianmetamorfosedatoen hos kontroldyrene.

Tillæg 5

GENETISK KØNSBESTEMMELSE

Metoden til genetisk kønsbestemmelse for *Xenopus laevis* er baseret på Yoshimoto *et al.*, 2008. De detaljerede procedurer for genotypebestemmelse kan om nødvendigt findes i denne publikation. Alternative metoder (f.eks. high-throughput qPCR) kan anvendes, hvis det skønnes hensigtsmæssigt.

X. laevis-primere

DM-W-markør

Fremadrettet: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Bagudrettet: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Positiv kontrol

Fremadrettet: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Bagudrettet: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Oprensning af DNA

Oprens DNA fra muskel- eller hudvæv ved hjælp af f.eks. Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (kategori nr. 69506) eller tilsvarende i henhold til instruktionerne i kittet. DNA kan elueres fra kolonner til oprensning, idet der anvendes mindre buffer for at opnå mere koncentrerede prøver, hvis det skønnes nødvendigt med henblik på PCR. Da DNA er ret stabilt, er det vigtigt at undgå krydskontaminering, der vil kunne føre til forkert karakterisering af hanner som hunner eller omvendt.

PCR

En prøveprotokol, der anvender JumpStart™ *Taq* fra Sigma, er skitseret i **tabel 1**.

Tabel 1: Prøveprotokol, der anvender JumpStart™ *Taq* fra Sigma

Mastermix	1x (µl)	[Endelig]
NFW	11	-
10X buffer	2,0	-

MgCl ₂ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP's (10 mM hver)	0,4	200 µm
Markør for primer (8 µm)	0,8	0,3 µm
Markør for bagudrettet primer (8 µm)	0,8	0,3 µm
Kontrol af primer (8 µm)	0,8	0,3 µm
Kontrol af primer (8 µm)	0,8	0,3 µm
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 enheder/µl
DNA-skabelon	1,0	~200 pg/µl

Bemærk: Ved fremstillingen af mastermix fremstilles der ekstra for at tage hensyn til et eventuelt tab i forbindelse med pipettering (eksempel: 25x bør anvendes til blot 24 reaktioner).

Reaktion:

Mastermix 19,0 µl

Skabelon 1,0 µl

I alt 20,0 µl

Thermocyclerprofil:

Trin 1. 94 °C 1 min.

Trin 2. 94 °C 30 sek.

Trin 3: 60 °C 30 sek.

Trin 4. 72 °C 1 min.

Trin 5. Gå til trin 2. 35 cyklusser

Trin 6. 72 °C 1 min.

Trin 7. 4 °C stop

PCR-produkter kan straks køres igennem en gel, eller de kan lagres ved 4 °C.

Agarosegelelektroforese (3 %)(prøveprotokol)

50X TAE

Tris 24,2 g
 Iseddikesyre 5,71 ml
 $\text{Na}_2(\text{EDTA}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,72 g
 Tilsæt vand op til 100 ml

1X TAE

H_2O 392 ml
 50X TAE 8 ml

3:1 agarose

3 dele NuSieve™ GTG™ agarose
 1 del Fisher agarose lav elektro-osmose (EEO)

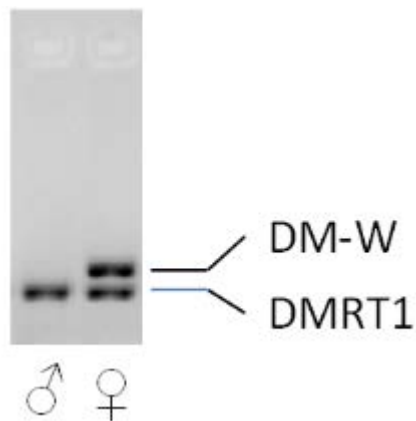
Metode

1. Fremstil en 3 % gel ved at tilsætte 1,2 g agaroseblanding til 43 ml 1X TAE. Omryst forsigtigt for at opløse større klumper.
2. Agaroseblandingen kommes i mikrobølgeovn, indtil den er helt opløst (undgå, at den koger over). Afkøles lidt.
3. Tilsæt 1,0 µl etidiumbromid (10 mg/ml). Omryst forsigtigt kolben. Bemærk, at ethidiumbromid er et mutagen, så alternative kemikalier bør, så vidt det er teknisk muligt, anvendes på dette trin for at minimere sundhedsfaren for arbejdstagerne¹.
4. Hæld gel i formen med blad. Afkøl fuldstændigt.
5. Tilsæt gel til apparaturet. Dæk gelen med 1X TAE.
6. Tilsæt 1 µl 6x loading dye til hvert 10 µl PCR-produkt.
7. Pipetter prøver i brøndene.
8. Kør ved 160 konstant spænding i ~20 minutter.

¹ I henhold til artikel 4, stk. 1, i Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2004/37/EF af 29. april 2004 om beskyttelse af arbejdstagerne mod risici for under arbejdet at være udsat for kræftfremkaldende stoffer eller mutagener (sjette særdirektiv i henhold til artikel 16, stk. 1, i Rådets direktiv 89/391/EØF) (EUT L 158, 30.4.2004, s. 50).

Et agarosegelbillede, som viser de båndmønstre, der er, indikerer han- og hunindivider, er vist i **figur 1**.

Figur 1: Agarosegelbillede, som viser det båndmønster, der indikerer et hanindivid (♂) (enkelt bånd ~203 bp: DMRT1) og et hunindivid (♀) (to bånd ved ~259 bp: DM-W og 203 bp:DMRT1).



LITTERATUR

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2469-2474.

Tillæg 6

MÅLING AF VITELLOGENIN

Målingen af vitellogenin (VTG) foretages ved hjælp af en enzymkoblet immunadsorptionsteknik (ELISA), der oprindeligt blev udviklet til tykhovedet elritse VTG (Parks *et al.*, 1999). Der findes i øjeblikket ingen kommercielt tilgængelige antistoffer for *X. laevis*. På grund af den righoldige information om dette protein og tilgængeligheden af omkostningseffektive kommercielle antistofproduktionstjenester, er det dog rimeligt at antage, at laboratorierne let kan udvikle et ELISA med henblik på denne måling (Olmstead *et al.*, 2009). Også Olmstead *et al.* (2009) har en beskrivelse af assayet som ændret for VTG i *X. tropicalis*, som vist nedenfor. Metoden anvender et antistof mod *X. tropicalis* VTG, men det er velkendt, at den også fungerer for *X. laevis* VTG. Det bemærkes, at ikke-konkurrerende ELISA'er også kan anvendes, og at disse kan have lavere detektionsgrænser end den nedenfor beskrevne metode.

Materialer og reagenser

- præadsorberet 1. antistof (Ab) serum

Bland 1 del anti-*X. tropicalis* VTG 1. Ab serum med 2 dele kontrolhanplasma ved rumtemperatur i ~ 75 minutter, sæt på is i 30 min., centrifuger > 20K x G i 1 time ved 4 °C, fjern supernatant, delp prøve, opbevar ved -20 °C.

- 2. antistof

Ged anti-kanin IgG-HRP-konjugat (f.eks. Bio-Rad 172-1019)

- VTG-standard

oprenset *X. laevis* VTG ved 3,3 mg/ml

- TMB (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidin) (f.eks. KPL 50-76-00; eller Sigma T0440)
- normalt gedeserum (NGS) (f.eks. Chemicon® S26-100 ml)
- 96-brønds EIA polystyrenmikrotiterplader (f.eks. ICN: 76-381-04, Costar:53590, Fisher:07-200-35)
- 37 °C hybridiseringsovn (eller hurtig ækvilibrering i inkubator) til plader, vandbad til rør
- andet almindeligt laboratorieudstyr, kemikalier og forsyninger.

Opskrifter

Coatingbuffer (50 mM karbonatbuffer, pH 9,6):

NaHCO₃ 1,26 g

Na₂CO₃ 0,68 g

vand 428 ml

10X PBS (0,1 M phosphat, 1,5 M NaCl):

NaH₂PO₄·H₂O 0,83 g

Na₂HPO₄·7 H₂O 20,1 g

NaCl 71 g

vand 810 ml

Vaskebuffer (PBST):

10X PBS 100 ml

vand 900 ml

Juster pH til 7,3 med 1 M HCl, og tilsæt derefter 0,5 ml Tween-20.

Assaybuffer:

normalt gedeserum (NGS) 3,75 ml

Vaskebuffer 146,25 ml

Prøvetagning

Blod opsamles med et hepariniseret mikrohæmatokritrør og lægges på is. Efter centrifugering i 3 min. ridses røret, brækkes åbent, og plasmaet overføres til 0,6 ml mikrocentrifugeringsrør, der indeholder 0,13 enheder lyofiliseret aprotinin. (Disse rør klargøres på forhånd ved at tilsætte en passende mængde aprotinin, nedfryse og lyofilisere i en speed-vac ved lav varme, indtil det er tørt). Plasma opbevares ved -80 °C, indtil det skal analyseres.

Fremgangsmåde for en plade

Overfladebehandling af pladen

Bland 20 µl oprenset VTG med 22 ml karbonatbuffer (slutopløsning 3 µg/ml). Tilsæt 200 µl til hver brønd i en 96-brønnds plade. Dæk pladen med klæbende overtræksfilm, og lad den inkubere ved 37 °C i 2 timer (eller ved 4 °C natten over).

Blokering af pladen

Blokeringsopløsningen fremstilles ved at tilsætte 2 ml normalt gedeserum (NGS) til 38 ml karbonatbuffer. Fjern overfladebehandlingsopløsningen, og ryst pladen tør. Tilsæt 350 µl af

blokeringsopløsningen til hver brønd. Dæk med klæbende overtræksfilm, og inkuber ved 37 °C i 2 timer (eller ved 4 °C natten over).

Fremstilling af standarder

5,8 µl oprenset VTG-standard blandes med 1,5 ml assaybuffer i et 12 x 75 mm borosilikatreagensglas til engangsbrug. Dette giver 12 760 ng/ml. Dernæst laves der en seriel fortynding ved at tilsætte 750 µl af den forrige fortynding til 750 µl assaybuffer for at nå frem til slutfortyndinger på 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 og 50 ng/ml.

Klargøring af prøver

Begynd med en 1:300- (f.eks. bland 1 µl plasma med 299 µl assaybuffer) eller 1:30-fortynding af plasma i assaybuffer. Hvis der forventes en stor mængde VTG, kan yderligere eller større fortyndinger være nødvendige. Forsøg at holde B/B₀ inden for standardintervallet. Er der tale om prøver uden større mængder VTG, f.eks. kontrollanner og -hunner (som alle er umodne), anvendes 1:30-fortyndingen. Prøver, der er fortyndet mindre end dette, kan udvise uønskede matrixeffekter.

Derudover anbefales det, at der køres en positiv kontrol på hver plade. Denne stammer fra en plasmapulje indeholdende yderst inducerede VTG-niveauer. Puljen er indledningsvis fortyndet i NGS, delt i delprøver og lagret ved -80 °C. En delprøve pr. plade optøs og fortyndes yderligere i assaybuffer og køres på samme måde som testprøven.

Inkubation med 1. antistof

Det 1. antistof fremstilles ved at lave en 1:2 000-fortynding af præadsorberet 1. antistofserum i assaybuffer (f.eks. 8 µl til 16 ml assaybuffer). Bland 300 µl opløsning af 1. antistof med 300 µl prøve/standard i et glasrør. B₀-røret klargøres på samme måde med 300 µl assaybuffer og 300 µl antistof. NSB-røret bør ligeledes klargøres med blot 600 µl assaybuffer, dvs. ingen antistof. Dæk rørene med Parafilm, og omryst forsigtigt. Inkuberes i vandbad ved 37 °C i 1 time.

Vask af pladen

Lige før inkubationen af 1. antistof er færdig, vaskes pladen. Dette sker ved at ryste indholdet ud og duppe den tør på absorberende papir. Fyld derefter brøndene med 350 µl vaskeopløsning, hæld ud, og dup tør. En multikanal gentagelsespipette eller pladevasker er nyttig her. Vasketrinnet gentages to gange, så pladen vaskes i alt tre gange.

Påfyldning af pladen

Når pladen er blevet vasket, fjernes rørene fra vandbadet og omrystes let. Tilsæt 200 µl fra hver prøve, standard, B₀ og NSB-rør til to brønde på pladen. Dæk pladen med klæbende overtræksfilm, og lad den inkubere i 1 time ved 37 °C.

Inkubation med 2. antistof

Ved afslutningen af inkubationen på det foregående trin vaskes pladen igen som beskrevet ovenfor. Det fortyndede 2. antistof fremstilles ved at blande 2,5 µl af 2. antistof med 50 ml assaybuffer. Tilsæt 200 µl fortyndet 2. antistof til hver brønd, forsegl som beskrevet ovenfor, og inkuber pladen i 1 time ved 37 °C.

Tilsætning af substrat

Når inkubationen med det 2. antistof er afsluttet, vaskes pladen tre gange som beskrevet ovenfor. Tilsæt derefter 100 µl TMB substrat til hver brønd. Lad det reagere i 10 minutter, helst ikke i kraftigt lys. Stop reaktionen ved at tilsætte 100 µl 1 M phosphorsyre. Dette vil ændre farven fra blå til kraftig gul. Mål absorbansen ved 450 nm ved hjælp af en pladelæser.

Beregning af B/B₀

Træk den gennemsnitlige NSB-værdi fra alle målingerne. B/B₀ for hver prøve og standard beregnes ved at dividere absorbansværdien (B) med B₀-prøvens gennemsnitlige absorbans.

Standardkurve og bestemmelse af de ukendte mængder

Generer en standardkurve ved hjælp af grafiksoftware (f.eks. Slidewrite™ eller Sigma Plot®), der ekstrapolerer mængden fra B/B₀ i prøven på grundlag af B/B₀ standarder. Typisk er mængden plottet ind på en logaritmisk skala, og kurven er en sigmoidkurve. Den kan dog forekomme lineær, når der anvendes et snævert standardinterval. Udtag de korrekte prøvemængder til fortyndingsfaktoren, og angiv som mg VTG/ml plasma.

Bestemmelse af minimumsdetektionsgrænser (MDL)

Ofte, særlig hos normale hanner, er det ikke indlysende, hvordan resultater med lave værdier skal rapporteres. I disse tilfælde bør der anvendes 95 % "konfidensintervaller" til at bestemme, om værdien skal angives som nul eller som et andet tal. Hvis prøveresultatet ligger inden for konfidensintervallet for nulstandarden (B₀), bør resultatet angives som nul. Minimumsdetektionsgrænsen vil være den laveste standard, der konsekvent er forskellig fra nulstandarden, hvilket vil sige, at de to konfidensintervaller ikke overlapper hinanden. For alle prøveresultater, der ligger inden for konfidensintervallet for minimumsdetektionsniveauet eller derover, angives den beregnede værdi. Hvis prøven ligger mellem nulstandarden og minimumsdetektionsniveauet, bør halvdelen af minimumsdetektionsniveauet angives for værdien af denne prøve.

LITTERATUR

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113-125.

Tillæg 7

STATISTISK ANALYSE

LAGDA genererer tre former for data, der kan analyseres statistisk: (1) kvantitative kontinuerlige data, (2) tid til hændelse-data for udviklingsraterne (tid til NF stadium 62) og (3) ordinaldata i form af alvorsgrad eller udviklingsstadier fra histopatologiske evalueringer. Det anbefalede statistiske beslutningstræ for LAGDA fremgår af figur 1. Nedenfor findes ligeledes nogle kommentarer, der kan være nødvendige i forbindelse med udførelsen af den statistiske analyse af målingerne fra LAGDA. Til beslutningstræet bør resultaterne af målinger af dødelighed, vækst (vægt og længde) og lever-somatisk indeks (LSI) analyseres i henhold til grenen "Andre endepunkter".

Kontinuerlige data

Data for kontinuerlige endepunkter bør først kontrolleres for monotoni ved rangordenstransformation af data, tilpasning til en ANOVA-model og sammenligning af lineære og kvadratiske kontraster. Hvis dataene er monotone, bør der udføres en step-down Jonckheere-Terpstra trend test på replikatmedianer, og der udføres ikke andre analyser. Alternativt kan der for data, der er normalfordelt med varianshomogenitet, anvendes en step-down Williams-test. Hvis dataene ikke er monotone (kvadratisk kontrast er signifikant, mens den lineære kontrast ikke er signifikant), bør de analyseres ved hjælp af en blandet ANOVA-model. Dataene vurderes dernæst for normalitet (helst ved hjælp af Shapiro-Wilk- eller Anderson-Darling-test) og varianshomogenitet (helst ved hjælp af Levene-test). Begge test udføres på residualer på den blandede ANOVA-model. Ekspertvurderinger kan bruges i stedet for disse formelle test for normalitet og varianshomogenitet, selv om formelle test foretrækkes. Hvis dataene er normalt fordelt med homogen varians, er antagelserne for en blandet ANOVA opfyldt, og en signifikant behandlingseffekt bestemmes ved Dunnett-testen. Konstateres der anormalitet eller variansheterogenitet, bør der søges en normaliserende, variansstabiliserende transformation. Kan der ikke konstateres en sådan transformation, bestemmes en signifikant behandlingseffekt ved hjælp af Dunns test. Når det er muligt, udføres der en ensidet test i modsætning til en tosidet test, men det kræver en ekspertvurdering at afgøre, hvilken test der er hensigtsmæssig for et givent endepunkt.

Dødelighed

Data for dødelighed analyseres for den tidsperiode, der omfatter hele testen, og udtrykkes som den andel, der døde i hver enkelt beholder. Haletudser, der ikke fuldfører metamorfosen inden for den fastsatte tidsramme, haletudser, der indgår i larvedelprøvekohorten, unge frøer, der udvælges, og dyr, der måtte være døde som følge af forsøgsfejl, behandles som bortcensurerede data og bør ikke indgå i nævneren ved procentberegningen. Forud for enhver statistisk analyse bør dødelighedsandelene gennemgå en arcsin-kvadratrodstransformation. Alternativt kan step-down Cochran-Armitage-testen anvendes, eventuelt med en Rao-Scott-justering, når der er overdispersion.

Vægt og længde (vækstdata)

Hanner og hunner er ikke seksuelt dimorfe under metamorfosen, så vækstdataene for larvedelprøven bør analyseres uafhængigt af køn. Vækstdataene for unge frøer bør imidlertid analyseres separat på grundlag af genetisk køn. En logaritmisk transformation kan være nødvendig for disse endepunkter, da logaritmisk normalfordeling af størrelsesdata ikke er usædvanlig.

Lever-somatisk indeks (LSI)

Levervægten bør normaliseres som andele af den samlede kropsvægt (dvs. LSI) og analyseres separat på grundlag af genetisk køn.

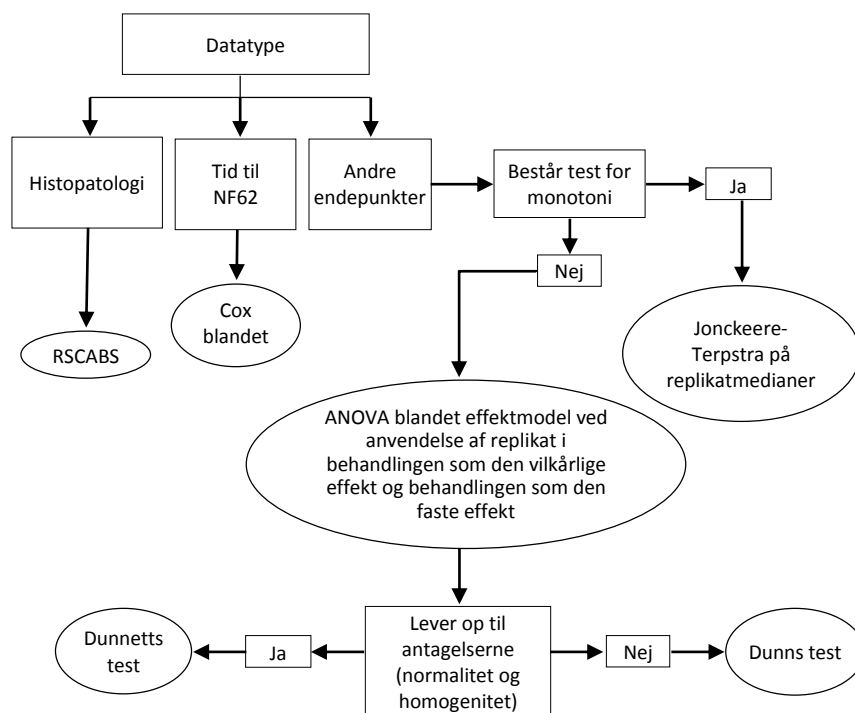
Tid til NF stadium 62

Tid til metamorfosedata bør behandles som tid til hændelse-data, idet eventuelle døde individer eller individer, der ikke når NF stadium 62 inden for 70 dage, behandles som højrecensurerede data (dvs. den reelle værdi er højere end 70 dage, men undersøgelsen afsluttes, inden dyrene har nået NF stadium 62 inden for 70 dage). Mediantiden til NF stadium 62-fuldførelse af metamorfose i fortyndingsvandskontrollerne anvendes til at bestemme datoen for afslutning af testen. Mediantiden til fuldførelse af metamorfosen kan bestemmes ved hjælp af Kaplan-Meier product-limit estimatorer. Dette endepunkt bør analyseres ved hjælp af Cox' blandede effektmodel for fare, der tager hensyn til undersøgelsens replikatstruktur.

Histopatologiske data (alvorsgrad og udviklingsstadier)

Histopatologiske data foreligger i form af alvorsgrad eller udviklingsstadier. En test kaldet RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) anvender en step-down Rao-Scott justeret Cochran-Armitage trend test på hver alvorsgrad i et histopatologisk respons (Green *et al.*, 2014). Rao-Scott justering indarbejder forsøgsdesignet med replikatbeholdere i testen. Proceduren "by Slices" indarbejder den biologiske forventning om, at effektens alvor har tendens til at stige med stigende doser eller koncentrationer, samtidig med at de individuelle niveauer bevares, og alvoren af eventuelle påviste effekter vises. RSCABS-proceduren bestemmer ikke blot, hvilke behandlinger der statistisk set er forskellige fra kontrollerne (dvs. har en mere alvorlig patologi end kontrolgrupperne), men ligeledes, ved hvilken alvorsgrad forskellen opstår, hvorved der skabes en yderst nødvendig kontekst for analysen. Foretages der inddeling i udviklingsstadier af kønskirtler samt ægge- og sædledere, bør en yderligere manipulering anvendes på dataene, da en af antagelserne i RSCABS er, at effektens alvor stiger med dosis. Den observerede effekt kan være en forsinket eller fremskyndet udvikling. Data om inddeling i udviklingsstadier bør derfor analyseres som anført for at påvise en fremskyndet udvikling og derefter manuelt inverteres, inden der gennemføres en ny analyse for at påvise en forsinket udvikling.

Figur 1: Statistisk beslutningstræ for LAGDA-data.



LITTERATUR

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 1108-1116.

Tillæg 8

OVERVEJELSER OMKRING PÅVISNING OG MINIMERING AF FOREKOMSTEN AF SCOLIOSE

Idiopatisk scoliose, der normalt viser sig som en "bøjet hale" hos haletudser af arten *Xenopus laevis*, kan komplicere de morfologiske og adfærdsmæssige observationer i testpopulationerne. Det bør tilstræbes at minimere eller eliminere forekomsten af scoliose både i bestanden generelt og under testforholdene. I den afsluttende test anbefales det, at prævalensen af moderat og alvorlig scoliose er under 10 % for at forbedre tilliden til, at testen kan påvise behandlingsrelaterede udviklingseffekter hos en ellers rask amfibielarve.

Daglige observationer under den afsluttende test bør registrere både forekomsten (antal individer) og alvoren af scoliose, når en sådan forekommer. Arten af abnormiteten beskrives både med hensyn til placering (*f.eks.* foran eller bag kloakåbningen) og kurvens retning (*f.eks.* lateral eller dorsal-til-ventral). Alvoren kan inddeles som følger:

(NR) Ikke markant: ingen bøjning

(1) Minimal: let, lateral bøjning bag kloakåbningen; kun synlig, når individet er i hvile

(2) Moderat: lateral bøjning bag kloakåbningen; synlig hele tiden, men forhindrer ikke bevægelse

(3) Alvorlig: lateral bøjning foran kloakåbningen; ELLER enhver bøjning, der forhindrer bevægelse; ELLER enhver dorsal-til-ventral bøjning.

Et amerikansk EPA FIFRA videnskabeligt rådgivende panel (FIFRA SAP 2013) gennemgik oversigtsdataene for scoliose i 15 Amphibian Metamorphosis Assays med *X. laevis* (NF stadium 51 til 60+) og fremkom med generelle henstillinger til nedbringelse af prævalensen af denne abnormitet i testpopulationerne. Henstillingerne er relevante for LAGDA, selv om denne test omfatter en længere udviklingstidslinje.

Historiske gyderesultater

Generelt bør der anvendes sunde voksne af høj kvalitet som ynglepar; eliminering af ynglepar, der avler afkom med scoliose, kan minimere forekomsten over tid. Helt specifikt kan det være hensigtsmæssigt at minimere brugen af avlsmateriale, der er fanget i naturen. LAGDA-eksponeringsperioden starter med NF stadium 8-til-10 embryoner, og det er ikke muligt fra testens start at bestemme, om bestemte individer vil udvise scoliose. Ud over påvisning af forekomsten af scoliose hos de dyr, der anvendes i testen, bør historiske data om et kuld resultater (herunder prævalensen af scoliose i enhver larve, der har fået lov at udvikle sig) således dokumenteres. Det kan være hensigtsmæssigt at overvåge den del af hvert kuld, der ikke anvendes i en bestemt undersøgelse, og at rapportere disse

observationer (FIFRA SAP 2013).

Vandkvalitet

Det er vigtigt at sikre en passende vandkvalitet både i laboratoriebestanden og under testen. Ud over kriterierne for vandkvalitet, der rutinemæssigt evalueres i akvatiske toksicitetstest, kan det være hensigtsmæssigt at overvåge for og korrigere eventuelle næringsstofmangler (f.eks. mangel på C-vitamin, calcium, phosphor) eller for høje niveauer af selen og kobber, der rapporteres at forårsage scoliose i varierende grad hos laboratorieopdrættede *Rana* sp. og *Xenopus* sp. (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; som rapporteret i FIFRA SAP 2013). Anvendelsen af en passende fodringsplan (jf. tillæg 4) og regelmæssig rengøring af beholderen vil generelt forbedre vandkvaliteten og forsøgsdyrenes sundhed.

Foder

Specifikke henstillinger til en fodringsplan, der har vist sig at være vellykket i LAGDA, findes i tillæg 4. Det anbefales, at foderkilderne screenes for biologiske toksiner, herbicider og andre pesticider, der er kendt for at forårsage scoliose hos *X. laevis* eller andre vandlevende dyr (Schlenk og Jenkins 2013). For eksempel er eksponering for visse kolinesterasehæmmere blevet knyttet til scoliose hos fisk (Schultz *et al.* 1985) og frøer (Bacchetta *et al.* 2008).

LITTERATUR

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, og G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. *Science of the Total Environment* 392: 110-118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont, og R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathrogenic effects of semicarbazide. *Toxicology* 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, og J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. *Journal of the World Aquaculture Society* 13: 322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, og D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 11: 445-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraiez, og P. Herraiez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. *Anatomical Records* 233(2): 314-320.

Schlenk, D., og Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP, referat nr. 2013-03. 21.-23. maj 2013. Washington, DC. "