



Συμβούλιο
της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Βρυξέλλες, 25 Φεβρουαρίου 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

ΔΙΑΒΙΒΑΣΤΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Αποστολέας:	Ευρωπαϊκή Επιτροπή / Ύπατη Εκπρόσωπος
Ημερομηνία Παραλαβής:	22 Φεβρουαρίου 2019
Αποδέκτης:	Γενική Γραμματεία του Συμβουλίου
Θέμα:	Παράρτημα του ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΥ (ΕΕ) .../... ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της XXX για την τροποποίηση, με σκοπό την προσαρμογή του στην τεχνική πρόοδο, του παραρτήματος του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 440/2008 για καθορισμό των μεθόδων δοκιμής κατ' εφαρμογή του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH)

Διαβιβάζεται συνημμένως στις αντιπροσωπίες το έγγραφο - Annex to D060575/02.

συνημμ.: Annex to D060575/02

Παράρτημα - Μέρος 2/2

B.71 *IN VITRO* ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΠΟΥ ΑΦΟΡΟΥΝ ΤΟ ΒΑΣΙΚΟ ΣΥΜΒΑΝ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΠΟΡΕΙΑ ΔΥΣΜΕΝΟΥΣ ΕΚΒΑΣΗΣ (ΑΟΡ) ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μέθοδος δοκιμών που βασίζεται στο βασικό συμβάν της ενεργοποίησης των δενδριτικών κυττάρων

1. Ευαισθητοποιητικές του δέρματος ονομάζονται οι ουσίες οι οποίες, όταν έρχονται επαφή με το δέρμα, προκαλούν αλλεργική αντίδραση όπως ορίζεται στο Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα των Ηνωμένων Εθνών για την Ταξινόμηση και Επισήμανση των Χημικών Ουσιών (GHS του ΟΗΕ) (1) και στον κανονισμό (ΕΕ) αριθ. 1272/2008 της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων (CLP)¹. Υπάρχει γενική συμφωνία για τα βασικά υποκείμενα βιολογικά συμβάντα στη δερματική ευαισθητοποίηση. Οι υπάρχουσες γνώσεις σχετικά με τους χημικούς και βιολογικούς μηχανισμούς που συνδέονται με τη δερματική ευαισθητοποίηση έχουν συνοψιστεί με τη μορφή μιας πορείας δυσμενούς έκβασης (Adverse Outcome Pathway, AOP) στο πλαίσιο του προγράμματος AOP του ΟΟΣΑ (2) – από το μοριακό εναρκτήριο συμβάν στα ενδιάμεσα συμβάντα και μέχρι δυσμενή επίδραση, δηλαδή την αλλεργική δερματίτιδα εξ επαφής. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το μοριακό εναρκτήριο συμβάν (δηλ. το πρώτο βασικό συμβάν) είναι η ομοιοπολική δέσμευση ηλεκτρονιόφιλων ουσιών σε πυρηνόφιλα κέντρα των πρωτεϊνών του δέρματος. Το δεύτερο βασικό συμβάν στην εν λόγω AOP επέρχεται στα κερατινοκύτταρα και περιλαμβάνει φλεγμονώδεις αποκρίσεις, καθώς και αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που συνδέονται με συγκεκριμένες πορείες κυτταρικής σηματοδότησης, όπως εκείνες που εξαρτώνται από το στοιχείο απόκρισης στα αντιοξειδωτικά/ηλεκτρονιόφιλα (Antioxidant Response Element, ARE). Το τρίτο βασικό συμβάν είναι η ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων (DC), που συνήθως αξιολογείται με βάση την έκφραση ειδικών δεικτών της κυτταρικής επιφάνειας,

¹ Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006, ΕΕ L 353 της 31.12.2008

χημειοκινών και κυτταροκινών. Το τέταρτο βασικό συμβάν είναι η ενεργοποίηση και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων T, που αξιολογείται έμμεσα με τη δοκιμασία επιχώριων λεμφοαδένων σε ποντικό (LLNA) (3).

2. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 442E του ΟΟΣΑ (2017). Περιγράφει *in vitro* δοκιμασίες που αφορούν τους μηχανισμούς που περιγράφονται σε σχέση με το βασικό συμβάν για την ενεργοποίηση των δένδριτικών κυττάρων της AOP για την ευαισθητοποίηση του δέρματος (2). Η μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει δοκιμές που προορίζονται για την υποστήριξη της διάκρισης ανάμεσα σε ευαισθητοποιητικές και μη ευαισθητοποιητικές του δέρματος ουσίες, σύμφωνα με το GHS του ΟΗΕ και τον κανονισμό CLP.

Οι δοκιμές που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι οι ακόλουθες:

- δοκιμή ενεργοποίησης ανθρώπινης κυτταρικής σειράς (h-CLAT)
 - δοκιμή ενεργοποίησης κυτταρικής σειράς U937 (U-SENSTM)
 - δοκιμασία γονιδίου αναφοράς ιντερλευκίνης 8 (δοκιμασία IL-8 Luc)
3. Οι δοκιμές που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών και στην αντίστοιχη TG του ΟΟΣΑ ενδέχεται να διαφέρουν σε σχέση με τη διαδικασία που χρησιμοποιείται για την παραγωγή των δεδομένων και των ενδείξεων που μετρώνται, αλλά μπορούν να χρησιμοποιούνται αδιακρίτως για τη συμμόρφωση προς τις εθνικές απαιτήσεις για αποτελέσματα δοκιμών σχετικά με το βασικό συμβάν για την ενεργοποίηση των δένδριτικών κυττάρων της AOP για την ευαισθητοποίηση του δέρματος, με παράλληλη αξιοποίηση της αμοιβαίας αποδοχής δεδομένων του ΟΟΣΑ.

Ιστορικό και αρχές των δοκιμών που περιλαμβάνονται στη μέθοδο δοκιμών με βάση το βασικό συμβάν

4. Η αξιολόγηση της δερματικής ευαισθητοποίησης περιλαμβάνει συνήθως τη χρήση πειραματόζων. Στις κλασικές μεθόδους στις οποίες χρησιμοποιούνται ινδικά χοιρίδια, όπως η δοκιμή Magnusson Kligman με μεγιστοποίηση σε ινδικά χοιρίδια και η δοκιμή Buehler (μέθοδος δοκιμών B.6) (4), αξιολογούνται τόσο το στάδιο επαγωγής όσο και το στάδιο πρόκλησης δερματικής ευαισθητοποίησης. Οι δοκιμές σε ποντικό, η LLNA (μέθοδος δοκιμών B.42) (3) και οι δύο τροποποιήσεις της χωρίς τη χρήση ραδιενέργειας, η LLNA: DA (μέθοδος δοκιμών B.50) (5) και η LLNA: BrdU-ELISA (μέθοδος δοκιμών B.51) (6), αξιολογούν αποκλειστικά την επαγωγική απόκριση και έχουν επίσης κριθεί αποδεκτές, δεδομένου ότι προσφέρουν ένα πλεονέκτημα έναντι των δοκιμών σε ινδικά χοιρίδια όσον αφορά την καλή μεταχείριση των ζώων, σε συνδυασμό με την αντικειμενική μέτρηση του επαγωγικού σταδίου της δερματικής ευαισθητοποίησης.

5. Πρόσφατα εγκρίθηκαν μέθοδοι δοκιμών μηχανιστικής βάσης *in chemico* και *in vitro* που αφορούν το πρώτο βασικό συμβάν [μέθοδος δοκιμών B.59, Άμεση ανάλυση πεπτιδικής δραστηριότητας (7)] και το δεύτερο βασικό συμβάν [μέθοδος δοκιμών B.60, Μέθοδος δοκιμών ARE-Nrf2/λουσιφεράσης (8)] της AOP ευαισθητοποίησης του δέρματος για την υποστήριξη της αξιολόγησης του δυναμικού επικινδυνότητας των χημικών ουσιών για ευαισθητοποίηση του δέρματος.
6. Οι δοκιμές που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών προσδιορίζουν ποσοτικά είτε τη μεταβολή στην έκφραση δεικτών της κυτταρικής επιφάνειας που συνδέονται με τη διεργασία ενεργοποίησης των μονοκυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων έπειτα από έκθεση σε ευαισθητοποιητικά (π.χ. CD54, CD86) είτε τις μεταβολές στην έκφραση της IL-8, μιας κυτταροκίνης που σχετίζεται με την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων. Έχει αναφερθεί ότι τα ευαισθητοποιητικά του δέρματος επάγουν την έκφραση δεικτών της κυτταρικής μεμβράνης, όπως οι CD40, CD54, CD80, CD83 και CD86, επιπροσθέτως προς την επαγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι IL-1 β και TNF- α , και αρκετών χημειοκινών, περιλαμβανομένης της IL-8 (CXCL8) και της CCL3 (9) (10) (11) (12), που σχετίζονται με την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων (2).
7. Ωστόσο, δεδομένου ότι η ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων αντιπροσωπεύει ένα μόνο βασικό συμβάν της AOP ευαισθητοποίησης του δέρματος (2) (13), οι πληροφορίες που παράγονται από δοκιμές που μετρούν μόνο δείκτες ενεργοποίησης των δενδριτικών κυττάρων μπορεί να μην επαρκούν για την εξαγωγή συμπεράσματος σχετικά με την παρουσία ή την απουσία δυναμικού δερματικής ευαισθητοποίησης των χημικών ουσιών. Ως εκ τούτου, προτείνεται η χρήση των δεδομένων που παράγονται με τις δοκιμές της παρούσας μεθόδου δοκιμών για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών (κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ/κανονισμός CLP) και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος, όταν χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο ολοκληρωμένων προσεγγίσεων για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση (IATA), σε συνδυασμό με άλλες συμπληρωματικές πληροφορίες, π.χ. που προκύπτουν από *in vitro* δοκιμασίες που αφορούν άλλα βασικά συμβάντα της AOP ευαισθητοποίησης του δέρματος καθώς και μεθόδους χωρίς δοκιμές, περιλαμβανομένης της σύγκρισης με χημικώς ανάλογες ουσίες (13). Παραδείγματα της χρήσης των δεδομένων που παράγονται με τις εν λόγω δοκιμές στο πλαίσιο καθορισμένων προσεγγίσεων, δηλαδή τυποποιημένων προσεγγίσεων τόσο σε σχέση με το σύνολο των χρησιμοποιούμενων πηγών πληροφοριών όσο και στο πλαίσιο της διαδικασίας που εφαρμόζεται στα δεδομένα για την πραγματοποίηση προβλέψεων, έχουν δημοσιευτεί (13) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χρήσιμα στοιχεία στο πλαίσιο της IATA.
8. Οι δοκιμές που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν καθαυτές, ούτε για την ταξινόμηση ευαισθητοποιητικών του δέρματος

στις υποκατηγορίες 1A και 1B, όπως ορίζονται στο GHS του ΟΗΕ / στον κανονισμό CLP, για τις αρχές που εφαρμόζουν τις εν λόγω προαιρετικές υποκατηγορίες, ούτε για την πρόβλεψη της ισχύος δράσης κατά τη λήψη αποφάσεων αξιολόγησης της ασφάλειας. Εντούτοις, ανάλογα με το κανονιστικό πλαίσιο, τα θετικά αποτελέσματα που προκύπτουν με τις παρούσες μεθόδους μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως έχουν για την ταξινόμηση μιας χημικής ουσίας στην κατηγορία 1 κατά GHS του ΟΗΕ / κανονισμό CLP.

9. Ο όρος «υπό δοκιμή χημική ουσία» χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών για να δηλώσει την ύλη που υποβάλλεται στη δοκιμή¹ και δεν σχετίζεται με την εφαρμοσιμότητα των δοκιμών για τον έλεγχο μονοσυστατικών ουσιών, πολυσυστατικών ουσιών και/ή μειγμάτων. Επί του παρόντος, υπάρχουν περιορισμένες διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με την εφαρμοσιμότητα των δοκιμών σε πολυσυστατικές ουσίες/μείγματα (14) (15). Οι δοκιμές είναι πάντως τεχνικά εφαρμόσιμες στον έλεγχο πολυσυστατικών ουσιών και μειγμάτων. Ωστόσο, πριν από τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών σε μείγμα για την παραγωγή δεδομένων για συγκεκριμένο κανονιστικό σκοπό, θα πρέπει να εξετάζεται αν – και, εάν ναι, για ποιον λόγο – μπορεί να αποδώσει αποτελέσματα κατάλληλα για τον επιδιωκόμενο σκοπό². Τέτοια εξέταση δεν χρειάζεται όταν οι κανονιστικές ρυθμίσεις επιβάλλουν τον έλεγχο του μείγματος. Επιπλέον, κατά τον έλεγχο πολυσυστατικών ουσιών ή μειγμάτων, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πιθανή παρεμπόδιση των παρατηρούμενων αποκρίσεων από κυτταροτοξικά συστατικά.

¹ Τον Ιούνιο του 2013, η κοινή συνεδρίαση του ΟΟΣΑ συμφώνησε ότι, όπου είναι δυνατόν, ο όρος «υπό δοκιμή χημική ουσία» που δηλώνει την ύλη που υποβάλλεται σε δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιείται με μεγαλύτερη συνέπεια στις νέες και επικαιροποιημένες κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών του ΟΟΣΑ.

² Η διατύπωση αυτή προτάθηκε και εγκρίθηκε κατά τη συνεδρίαση του WNT του Απριλίου 2014.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (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. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: 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. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [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).
- (3) Κεφάλαιο B.42 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμασία επιχώριων λεμφαδένων. Κεφάλαιο B.6 του παρόντος παραρτήματος: Ευαισθητοποίηση του δέρματος.
- (4) Κεφάλαιο B.50 του παρόντος παραρτήματος: Ευαισθητοποίηση του δέρματος: Δοκιμασία επιχώριων λεμφαδένων: DA.
- (5) Κεφάλαιο B.51 του παρόντος παραρτήματος: Ευαισθητοποίηση του δέρματος: Δοκιμασία επιχώριων λεμφαδένων: BrdU-ELISA.
- (6) Κεφάλαιο B.59 του παρόντος παραρτήματος: Ευαισθητοποίηση του δέρματος *in chemico*: Άμεση ανάλυση πεπτιδικής δραστηριότητας (DPRA).
- (7) Κεφάλαιο B.60 του παρόντος παραρτήματος: Ευαισθητοποίηση του δέρματος *in vitro*: Μέθοδος δοκιμών ARE-Nrf2/λουσιφεράσης.
- (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, and 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, and 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, and 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 & 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. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: <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. Sci.* 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.

Προσάρτημα 1

ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ *IN VITRO*: ΔΟΚΙΜΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ (H-CLAT)

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

1. Η h-CLAT χρησιμεύει στον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολών στην έκφραση δεικτών της κυτταρικής επιφάνειας που συνδέονται με τη διεργασία ενεργοποίησης των μονοκυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων (DC) (δείκτες CD86 και CD54), στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά μονοκυτταρικής λευχαιμίας THP-1, κατόπιν έκθεσης σε ευαισθητοποιητικά (1)(2). Στη συνέχεια, τα μετρηθέντα επίπεδα έκφρασης των δεικτών CD86 και CD54 χρησιμοποιούνται για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος.
2. Η h-CLAT έχει αξιολογηθεί σε μελέτη επικύρωσης του εργαστηρίου αναφοράς της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τις εναλλακτικές μεθόδους αντί των δοκιμών σε ζώα (EURL ECVAM) και σε επακόλουθη ανεξάρτητη αξιολόγηση από ομοτίμους από τη Συμβουλευτική Επιστημονική Επιτροπή EURL ECVAM (ESAC). Αφού έλαβε υπόψη όλα τα διαθέσιμα στοιχεία και τις απόψεις των ρυθμιστικών αρχών και των ενδιαφερόμενων μερών, το EURL ECVAM (3) συνέστησε τη χρήση της h-CLAT στο πλαίσιο IATA για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών με σκοπό την ταξινόμηση και επισήμανση του κινδύνου. Παραδείγματα σχετικά με τη χρήση δεδομένων h-CLAT σε συνδυασμό με άλλα στοιχεία έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).
3. Διαπιστώθηκε ότι η h-CLAT μπορεί να εφαρμοστεί σε εργαστήρια που διαθέτουν εμπειρία στη χρήση τεχνικών κυτταροκαλλιέργειας και ανάλυσης κυτταρομετρίας ροής. Ο βαθμός αναπαραγωγιμότητας των προβλέψεων που αναμένεται να παρέχει η δοκιμή είναι της τάξης του 80 % ενδοεργαστηριακά και διεργαστηριακά (3)(12). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη επικύρωσης (13) και άλλες δημοσιευμένες μελέτες (14) υποδεικνύουν συνολικά ότι, σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της LLNA, η ορθότητα της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών (κατηγορίας 1 κατά GHS του OHE / κανονισμό CLP) και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος είναι 85 % (N=142), με ευαισθησία 93 % (94/101) και ειδικότητα 66 % (27/41) [βάσει εκ νέου ανάλυσης του EURL ECVAM (12) στο πλαίσιο της οποίας ελήφθησαν υπόψη όλα τα υπάρχοντα δεδομένα και δεν ελήφθησαν υπόψη τα αρνητικά αποτελέσματα για τις χημικές ουσίες με Log Kow άνω του 3,5, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4]. Οι ψευδοαρνητικές προβλέψεις με την h-CLAT αφορούν πιθανότατα χημικές ουσίες που εμφανίζουν χαμηλή έως μέτρια ισχύ ευαισθητοποίησης του δέρματος (υποκατηγορία 1B κατά GHS του OHE / κανονισμό CLP)

παρά ουσίες που εμφανίζουν υψηλή ισχύ ευαισθητοποίησης του δέρματος (υποκατηγορία 1A κατά GHS του OHE / κανονισμό CLP) (4)(13)(15). Συνολικά, τα στοιχεία αυτά δείχνουν τη χρησιμότητα της μεθόδου h-CLAT ως εργαλείου που συμβάλλει στον προσδιορισμό της επικινδυνότητας ως προς την ευαισθητοποίηση του δέρματος. Ωστόσο, οι τιμές ορθότητας που παρέχονται εδώ για την h-CLAT ως αυτοτελή δοκιμή είναι απλώς ενδεικτικές, δεδομένου ότι η δοκιμή θα πρέπει να εξετάζεται σε συνδυασμό με άλλες πηγές πληροφοριών στο πλαίσιο IATA και σύμφωνα με τις πληροφορίες στις παραγράφους 7 και 8 της γενικής εισαγωγής. Επιπλέον, κατά την αξιολόγηση των μεθόδων δοκιμών ευαισθητοποίησης του δέρματος χωρίς χρήση ζώων, θα πρέπει να μη λησμονείται ότι η δοκιμασία LLNA, καθώς και άλλες δοκιμές σε ζώα, ενδέχεται να μην αντικατοπτρίζουν πλήρως την κατάσταση στον άνθρωπο.

4. Με βάση το σύνολο των διαθέσιμων δεδομένων, η μέθοδος δοκιμών h-CLAT είναι εφαρμόσιμη σε υπό δοκιμή χημικές ουσίες που καλύπτουν ποικιλία οργανικών λειτουργικών ομάδων, μηχανισμών αντίδρασης, επιπέδων ισχύος ευαισθητοποίησης του δέρματος (όπως προσδιορίζονται σε μελέτες *in vivo*) και φυσικοχημικών ιδιοτήτων (3)(14)(15). Η μέθοδος δοκιμών h-CLAT είναι εφαρμόσιμη σε υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι διαλυτές ή σχηματίζουν σταθερή διασπορά (δηλ. κολλοειδές ή εναιώρημα στο οποίο η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν καθιζάνει ούτε διαχωρίζεται από τον διαλύτη/φορέα σε διαφορετικές φάσεις) σε κατάλληλο διαλύτη/φορέα (βλ. παράγραφο 14). Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες με Log Kow άνω του 3,5 τείνουν να δώσουν ψευδοαρνητικά αποτελέσματα (14). Ως εκ τούτου, τα αρνητικά αποτελέσματα με υπό δοκιμή χημικές ουσίες με Log Kow άνω του 3,5 δεν θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη. Αντιθέτως, τα θετικά αποτελέσματα που προκύπτουν με υπό δοκιμή χημικές ουσίες με Log Kow άνω του 3,5 μπορούν να χρησιμοποιούνται για την υποστήριξη του χαρακτηρισμού της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ως ευαισθητοποιητικού. Επιπλέον, λόγω της περιορισμένης μεταβολικής ικανότητας της χρησιμοποιούμενης κυτταρικής σειράς (16) και λόγω των πειραματικών συνθηκών, τα μεταβολικά προαπτενία (δηλ. οι ουσίες που απαιτούν ενζυμική ενεργοποίηση, π.χ. μέσω των ενζύμων P450) και τα αβιοτικά προαπτενία (δηλ. οι ουσίες που ενεργοποιούνται με οξείδωση), και ιδίως όσα χαρακτηρίζονται από χαμηλή ταχύτητα οξείδωσης, μπορεί επίσης να δώσουν αρνητικά αποτελέσματα στην h-CLAT (15). Παρότι οι φθορίζουσες ουσίες μπορούν να αξιολογηθούν με την h-CLAT (17), οι ισχυρά φθορίζουσες ουσίες που εκπέμπουν στο ίδιο μήκος κύματος με την ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) ή το ιωδιούχο προπίδιο (PI) παρεμποδίζουν την κυτταρομετρική ανίχνευση ροής και, ως εκ τούτου, δεν μπορούν να αξιολογηθούν σωστά με χρήση συζευγμένων με FITC αντισωμάτων ή PI. Σε αυτή την περίπτωση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλα σημασμένα με φθοριοχρώματα αντισώματα ή άλλοι δείκτες κυτταροτοξικότητας, αντίστοιχα, εφόσον μπορεί να καταδειχθεί ότι παρέχουν ανάλογα αποτελέσματα με τα σημασμένα με FITC αντισώματα (βλ. παράγραφο 24) ή το PI (βλ. παράγραφο 18) π.χ. μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 1-2. Υπό το πρίσμα

των ανωτέρω, τα αρνητικά αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται στο πλαίσιο των αναφερόμενων περιορισμών και σε συνάρτηση με άλλες πηγές πληροφοριών στο πλαίσιο ΙΑΤΑ. Εάν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η μέθοδος δοκιμών h-CLAT δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε άλλες ειδικές κατηγορίες χημικών ουσιών, η μέθοδος δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τις συγκεκριμένες κατηγορίες.

5. Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, η μέθοδος h-CLAT υποστηρίζει τη διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος. Ωστόσο, μπορεί ενδεχομένως να συμβάλει στην εκτίμηση της ευαισθητοποιητικής ισχύος (4)(5)(9), όταν χρησιμοποιείται σε ολοκληρωμένες προσεγγίσεις, όπως οι ΙΑΤΑ. Απαιτούνται πάντως περισσότερες εργασίες, κατά προτίμηση με βάση δεδομένα για τον άνθρωπο, για να διαπιστωθεί ο τρόπος με τον οποίο τα αποτελέσματα της h-CLAT θα μπορούσαν ενδεχομένως να τροφοδοτήσουν την εκτίμηση της ευαισθητοποιητικής ισχύος.
6. Οι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Η μέθοδος h-CLAT είναι μια *in vitro* δοκιμασία με την οποία προσδιορίζονται ποσοτικά οι μεταβολές της έκφρασης των δεικτών κυτταρικής επιφάνειας (δηλ. των CD86 και CD54) σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά μονοκυτταρικής λευχαιμίας, στα κύτταρα THP-1, μετά από έκθεση 24 ωρών στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Τα εν λόγω επιφανειακά μόρια αποτελούν τυπικούς δείκτες της ενεργοποίησης των μονοκυττάρων THP-1 και μπορούν να μιμούνται την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων, η οποία διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην προδιέγερση των T κυττάρων. Οι μεταβολές της έκφρασης επιφανειακών δεικτών μετρώνται με κυτταρομετρία ροής μετά από χρώση των κυττάρων με σημασμένα με φθοριοχρώματα αντισώματα. Ταυτόχρονα, διεξάγεται επίσης μέτρηση της κυτταροτοξικότητας προκειμένου να διαπιστωθεί εάν αυξάνεται η έκφραση των επιφανειακών δεικτών σε υποκυτταροτοξικές συγκεντρώσεις. Η σχετική ένταση φθορισμού των επιφανειακών δεικτών σε σύγκριση με τον μάρτυρα με διαλύτη/φορέα υπολογίζεται και χρησιμοποιείται στο μοντέλο πρόβλεψης (βλ. παράγραφο 26) για να υποστηριχθεί η διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών ουσιών.

ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

8. Πριν χρησιμοποιήσουν στην καθημερινή πρακτική τη δοκιμή που περιγράφεται στο παρόν προσάρτημα της μεθόδου δοκιμών B.71, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα, χρησιμοποιώντας τις 10 ουσίες ελέγχου ικανότητας που απαριθμούνται στο προσάρτημα 1.2. Επιπλέον, οι χρήστες της δοκιμής θα πρέπει να διατηρούν βάση ιστορικών δεδομένων με τα δεδομένα που προκύπτουν από τους ελέγχους

δραστικότητας (βλ. παράγραφο 11) και με τους θετικούς μάρτυρες και τους μάρτυρες με διαλύτη/φορέα (βλ. παραγράφους 20-22), και θα πρέπει να χρησιμοποιούν τα εν λόγω δεδομένα για να βεβαιώνονται για τη διαχρονική αναπαραγωγικότητα της δοκιμής στο εργαστήριό τους.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

9. Η παρούσα δοκιμή βασίζεται στο πρωτόκολλο αριθ. 158 της υπηρεσίας βάσης δεδομένων h-CLAT για τις εναλλακτικές μεθόδους αντί των πειραμάτων σε ζώα (DB-ALM) (18), το οποίο είναι αντίστοιχο του πρωτοκόλλου που χρησιμοποιείται για τη μελέτη επικύρωσης που συντονίζεται από το EURL ECVAM. Συνιστάται να χρησιμοποιείται αυτό το πρωτόκολλο κατά την εφαρμογή και χρήση της μεθόδου h-CLAT στο εργαστήριο. Στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται τα βασικά στοιχεία και διαδικασίες για τη μέθοδο h-CLAT, η οποία περιλαμβάνει δύο στάδια: *δοκιμασία προσδιορισμού δόσης και μέτρηση έκφρασης CD86/CD54*.

Προπαρασκευή των κυττάρων

10. Για την εφαρμογή της μεθόδου h-CLAT θα πρέπει να χρησιμοποιείται η ανθρώπινη κυτταρική σειρά μονοκυτταρικής λευχαιμίας THP-1. Συνιστάται τα κύτταρα (TIB-202™) να λαμβάνονται από επαρκώς εξειδικευμένη τράπεζα κυττάρων, όπως η American Type Culture Collection.
11. Τα κύτταρα THP-1 καλλιεργούνται στους 37°C και σε ατμόσφαιρα με υγρανση και 5 % CO₂ σε θρεπτικό μέσο RPMI-1640 συμπληρωμένο με 10 % βόειου εμβρυϊκού ορού (FBS), 0,05 mM 2-μερκαπτοαιθανόλης, 100 μονάδες/ml πενικιλίνης και 100 μg/ml στρεπτομυκίνης. Η χρήση πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας μπορεί να παραλειφθεί. Ωστόσο, σε αυτή την περίπτωση, οι χρήστες θα πρέπει να βεβαιώνονται ότι η απουσία αντιβιοτικών στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα, π.χ. μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας που απαριθμούνται στο προσάρτημα 1.2. Σε κάθε περίπτωση, για τον περιορισμό του κινδύνου μόλυνσης στο ελάχιστο, θα πρέπει να ακολουθούνται οι ορθές πρακτικές καλλιέργειας κυττάρων, ανεξάρτητα από την παρουσία ή μη αντιβιοτικών στο θρεπτικό μέσο κυττάρων. Τα κύτταρα THP-1 εμβολιάζονται συνήθως κάθε 2-3 ημέρες σε πυκνότητα 0,1 έως 0,2 × 10⁶ κύτταρα/ml. Θα πρέπει να διατηρούνται σε πυκνότητες από 0,1 έως 1,0 × 10⁶ κύτταρα/ml. Πριν από τη χρήση τους στις δοκιμές, θα πρέπει να ελέγχεται εάν τα κύτταρα πληρούν τα κριτήρια μέσω της διεξαγωγής ελέγχου δραστηριότητας. Ο έλεγχος δραστηριότητας των κυττάρων θα πρέπει να διενεργείται με χρήση των θετικών μαρτύρων 2,4-δινιτροχλωροβενζόλιο (DNCB) (αριθ. CAS 97-00-7, καθαρότητα ≥ 99 %) και θειικό νικέλιο (NiSO₄) (αριθ. CAS 10101-97-0, καθαρότητα ≥ 99 %) και του αρνητικού μάρτυρα γαλακτικό οξύ (LA) (αριθ. CAS 50-21-5, ≥ καθαρότητα 85 %), δύο εβδομάδες μετά την

απόψυξη. Αμφότερα τα DNCB και NiSO_4 θα πρέπει να επάγουν θετική απόκριση και των δύο δεικτών κυτταρικής επιφάνειας CD86 και CD54, ενώ το LA θα πρέπει να επάγει αρνητική απόκριση και των δύο δεικτών. Για τη δοκιμασία πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο κύτταρα που έχουν υποβληθεί επιτυχώς στον έλεγχο δραστηριότητας. Τα κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται έως δύο μήνες μετά την απόψυξη. Ο αριθμός των ανακαλλιέργειών δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις 30. Ο έλεγχος δραστηριότητας θα πρέπει να διενεργείται σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στις παραγράφους 20-24.

12. Για τη δοκιμή, κύτταρα THP-1 εμβολιάζονται σε πυκνότητα είτε $0,1 \times 10^6$ κύτταρα/ml είτε $0,2 \times 10^6$ κύτταρα/ml και προκαλλιεργούνται σε φιάλες καλλιέργειας επί 72 ώρες ή επί 48 ώρες αντίστοιχα. Είναι σημαντικό η πυκνότητα των κυττάρων στη φιάλη καλλιέργειας αμέσως μετά την περίοδο προκαλλιέργειας να είναι κατά το δυνατόν συνεπής σε κάθε πείραμα (με χρήση μίας από τις δύο συνθήκες προκαλλιέργειας που περιγράφονται ανωτέρω), διότι η πυκνότητα των κυττάρων στη φιάλη καλλιέργειας αμέσως μετά την προκαλλιέργεια μπορεί να επηρεάσει την έκφραση των CD86/CD54 που επάγουν τα αλλεργιογόνα (19). Την ημέρα της δοκιμής, κύτταρα που έχουν συλλεχθεί από την φιάλη καλλιέργειας επανεναιωρούνται με πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας σε πυκνότητα 2×10^6 κύτταρα/ml. Στη συνέχεια, τα κύτταρα κατανέμονται σε τρυβλίο επίπεδης βάσης 24 κοιλοτήτων με 500 μl (1×10^6 κύτταρα/κοιλοότητα) ή τρυβλίο επίπεδης βάσης 96 κοιλοτήτων με 80 μl ($1,6 \times 10^5$ κύτταρα/κοιλοότητα).

Δοκιμασία προσδιορισμού δόσης

13. Διεξάγεται *δοκιμασία προσδιορισμού δόσης* για τον προσδιορισμό της CV75, η οποία είναι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που δίνει κυτταρική βιωσιμότητα (CV) 75 % σε σύγκριση με τον μάρτυρα με διαλύτη/φορέα. Η τιμή CV75 χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των υπό δοκιμή χημικών ουσιών για τη μέτρηση της έκφρασης των CD86/CD54 (βλ. παραγράφους 20-24).

Παρασκευή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

14. Η παρασκευή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων γίνεται την ημέρα της δοκιμής. Για τη μέθοδο h-CLAT, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες διαλύονται ή διασπείρονται σταθερώς (βλ. επίσης παράγραφο 4) σε αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο, ως πρώτη επιλογή, ή σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, καθαρότητας $\geq 99\%$), ως δεύτερη επιλογή σε περίπτωση που η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν είναι διαλυτή ή δεν διασπείρεται σταθερώς στους δύο προηγούμενους διαλύτες/φορείς, σε τελικές συγκεντρώσεις 100 mg/ml (σε αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο) ή 500 mg/ml (σε DMSO). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι διαλύτες/φορείς, πέραν των όσων περιγράφονται ανωτέρω, εφόσον η χρήση τους τεκμηριώνεται επαρκώς επιστημονικά. Θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον τελικό διαλύτη/φορέα.

15. Ξεκινώντας από αποθεματικά διαλύματα των υπό δοκιμή χημικών ουσιών 100 mg/ml (σε αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο) ή 500 mg/ml (σε DMSO), γίνονται οι εξής αραιώσεις:

- για διαλύτη/φορέα αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο: παρασκευάζονται οκτώ αποθεματικά διαλύματα (οκτώ συγκεντρώσεις), με διαδοχικές αραιώσεις 2x με χρήση του αντίστοιχου διαλύτη/φορέα. Στη συνέχεια, αυτά τα αποθεματικά διαλύματα αραιώνονται περαιτέρω 50x σε θρεπτικό μέσο (διαλύματα εργασίας). Εάν η ανώτερη τελική συγκέντρωση στο τρυβλίο των 1 000 µg/ml είναι μη τοξική, η μέγιστη συγκέντρωση θα πρέπει να επαναπροσδιοριστεί με νέα δοκιμή κυτταροτοξικότητας. Η τελική συγκέντρωση στο τρυβλίο δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 5 000 µg/ml για υπό δοκιμή χημικές ουσίες διαλυμένες ή σταθερώς διεσπαρμένες σε αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο.
- για διαλύτη/φορέα DMSO: παρασκευάζονται οκτώ αποθεματικά διαλύματα (οκτώ συγκεντρώσεις), με διαδοχικές αραιώσεις 2x με χρήση του αντίστοιχου διαλύτη/φορέα. Στη συνέχεια, αυτά τα αποθεματικά διαλύματα αραιώνονται 250x σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (διαλύματα εργασίας). Η τελική συγκέντρωση στο τρυβλίο δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 1 000 µg/ml, ακόμη κι αν είναι μη τοξική.

Τα διαλύματα εργασίας χρησιμοποιούνται τελικά για την έκθεση, με προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος εργασίας στον όγκο του εναιωρήματος κυττάρων THP-1 στο τρυβλίο (βλ. επίσης παράγραφο 17) ώστε να πραγματοποιηθεί νέα αραιώση 2x (η τελική κλίμακα συγκεντρώσεων στο τρυβλίο είναι συνήθως 7,81–1 000 µg/ml).

16. Ο μάρτυρας με διαλύτη/φορέα που χρησιμοποιείται στη μέθοδο h-CLAT είναι θρεπτικό μέσο καλλιέργειας [για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που διαλύονται ή διασπείρονται σταθερά (βλ. παράγραφο 4) είτε σε θρεπτικό μέσο είτε σε αλατούχο διάλυμα] ή DMSO (για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που διαλύονται ή διασπείρονται σταθερά σε DMSO) που υποβάλλεται σε δοκιμή σε μία τελική συγκέντρωση 0,2 % στο τρυβλίο. Υποβάλλεται στην ίδια αραιώση που περιγράφεται για τα διαλύματα εργασίας στην παράγραφο 15.

Εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

17. Το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ή τα διαλύματα εργασίας που περιγράφονται στις παραγράφους 15 και 16 αναμιγνύονται 1:1 (κ.ό.) με τα εναιωρήματα κυττάρων που παρασκευάστηκαν στο τρυβλίο επίπεδης βάσης 24 ή 96 κοιλοτήτων (βλ. παράγραφο 12). Στη συνέχεια, τα υπό αγωγή τρυβλία επωάζονται επί 24±0,5 ώρες στους 37°C με 5 % CO₂. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την αποφυγή της εξάτμισης των πτητικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών, καθώς και της διασταυρούμενης μόλυνσης των μικροκοιλοτήτων από τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες, π.χ. με στεγανοποίηση του τρυβλίου πριν από την επώαση με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες (20).

Χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (PI)

18. Μετά από $24 \pm 0,5$ ώρες έκθεσης, τα κύτταρα μεταφέρονται στα σωληνάρια δειγμάτων και συλλέγονται μέσω φυγοκέντρωσης. Τα υπερκείμενα υγρά απορρίπτονται και τα εναπομείναντα κύτταρα εναιωρούνται εκ νέου με 200 μl (στην περίπτωση του τρυβλίου 96 κοιλοτήτων) ή 600 μl (στην περίπτωση του τρυβλίου 24 κοιλοτήτων) φωσφορικού αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει 0,1 % αλβουμίνης βόειου ορού (ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης). 200 μl κυτταρικού εναιωρήματος μεταφέρονται σε τρυβλίο στρογγυλής βάσης 96 κοιλοτήτων (στην περίπτωση του τρυβλίου 96 κοιλοτήτων) ή σε μικροσωληνάριο (στην περίπτωση του τρυβλίου 24 κοιλοτήτων) και εκπλένονται δύο φορές με 200 μl (στην περίπτωση του τρυβλίου 96 κοιλοτήτων) ή 600 μl (στην περίπτωση του τρυβλίου 24 κοιλοτήτων) ρυθμιστικού διαλύματος χρώσης. Τέλος, τα κύτταρα εναιωρούνται εκ νέου σε ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης (π.χ. 400 μl) και προστίθεται διάλυμα PI (π.χ. 20 μl) (για παράδειγμα, η τελική συγκέντρωση του PI είναι 0,625 μg/ml). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι δείκτες κυτταροτοξικότητας, όπως 7-αμινοακτινομυκίνη D (7-AAD), κυανό του τρυπανίου ή άλλοι δείκτες, εάν μπορεί να αποδειχθεί ότι οι εναλλακτικές χρώσεις αποδίδουν παρεμφερή με το PI αποτελέσματα, για παράδειγμα μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 1.2.

Μέτρηση κυτταροτοξικότητας μέσω κυτταρομετρίας ροής και εκτίμηση της τιμής CV75

19. Η πρόσληψη του PI αναλύεται με χρήση κυτταρομετρίας ροής με τον δίαυλο καταγραφής FL-3. Καταγράφονται συνολικά 10 000 ζώντα κύτταρα (αρνητικά για PI). Η κυτταρική βιωσιμότητα μπορεί να υπολογίζεται με χρήση της ακόλουθης εξίσωσης από το πρόγραμμα ανάλυσης του κυτταρόμετρου. Όταν η κυτταρική βιωσιμότητα είναι χαμηλή, θα πρέπει να καταγράφονται έως 30 000 κύτταρα, περιλαμβανομένων των νεκρών κυττάρων. Εναλλακτικά, μπορούν να καταγράφονται δεδομένα επί ένα λεπτό μετά την έναρξη της ανάλυσης.

$$\text{βιωσιμότητα} = \frac{\text{αριθμός ζωντανών κυττάρων}}{\text{συνολικός αριθμός μετρηθέντων κυττάρων}} \times 100$$

Η τιμή CV75 (βλ. παράγραφο 13), δηλαδή η συγκέντρωση από την οποία προκύπτει 75 % επιβίωση κυττάρων THP-1 (25 % κυτταροτοξικότητα), υπολογίζεται μέσω λογαριθμικής-γραμμικής παρεκβολής με χρήση της ακόλουθης εξίσωσης:

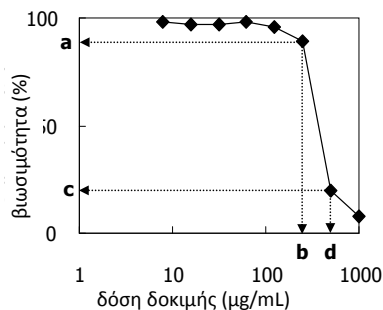
$$\text{Log CV75} = \frac{(75-c) \times \text{Log}(b) - (75-a) \times \text{Log}(d)}{a-c}$$

Όπου:

a είναι η ελάχιστη τιμή κυτταρικής βιωσιμότητας άνω του 75 %

c είναι η μέγιστη τιμή κυτταρικής βιωσιμότητας κάτω του 75 %

b και d είναι οι συγκεντρώσεις που εμφανίζουν την τιμή κυτταρικής βιωσιμότητας a και c αντίστοιχα



Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες προσεγγίσεις για τον υπολογισμό της τιμής CV75, εφόσον αποδεικνύεται ότι δεν έχουν επιπτώσεις στα αποτελέσματα (π.χ. μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας).

Μέτρηση έκφρασης των CD86/CD54

Παρασκευή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

20. Χρησιμοποιείται ο κατάλληλος διαλύτης/φορέας (αλατούχο διάλυμα, θρεπτικό μέσο ή DMSO, βλ. παράγραφο 14) για τη διάλυση ή τη σταθερή διασπορά των υπό δοκιμή χημικών ουσιών. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες αραιώνονται πρώτα στη συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο 100πλάσιο (για αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο) ή το 500πλάσιο (για DMSO) της τιμής $1,2 \times CV75$ που προσδιορίστηκε στη δοκιμασία προσδιορισμού δόσης (βλ. παράγραφο 19). Εάν δεν είναι εφικτός ο προσδιορισμός της τιμής CV75 (εάν δηλαδή δεν παρατηρείται επαρκής κυτταροτοξικότητα στη δοκιμασία προσδιορισμού δόσης), ως αρχική συγκέντρωση θα πρέπει να χρησιμοποιείται η υψηλότερη διαλυτή ή σταθερώς διασπειρόμενη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που παρασκευάζεται με κάθε διαλύτη/φορέα. Επισημαίνεται ότι η τελική συγκέντρωση στο τρυβλίο δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 5 000 μg/ml (σε περίπτωση αλατούχου διαλύματος ή θρεπτικού μέσου) ή τα 1 000 μg/ml (σε περίπτωση DMSO). Στη συνέχεια πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις 1,2x με χρήση του αντίστοιχου διαλύτη/φορέα προκειμένου να σχηματιστούν τα αποθεματικά διαλύματα [οκτώ συγκεντρώσεις από $100 \times 1,2 \times CV75$ έως $100 \times 0,335 \times CV75$ (για αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο) ή από $500 \times 1,2 \times CV75$ έως $500 \times 0,335 \times CV75$ (για DMSO)] που θα υποβληθούν σε δοκιμή με τη μέθοδο h-CLAT (βλ. πρωτόκολλο DB-ALM αριθ. 158 για ένα παράδειγμα δοσολογικού σχήματος). Στη

συνέχεια, τα αποθεματικά διαλύματα αραιώνονται περαιτέρω 50x (για αλατούχο διάλυμα ή θρεπτικό μέσο) ή 250 x (για DMSO) στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (διαλύματα εργασίας). Αυτά τα διαλύματα εργασίας χρησιμοποιούνται τελικά για την έκθεση με έναν περαιτέρω τελικό συντελεστή αραιώσης 2x στο τρυβλίο. Εάν τα αποτελέσματα δεν πληρούν τα κριτήρια αποδοχής που περιγράφονται στις παραγράφους 29 και 30 αναφορικά με την κυτταρική βιωσιμότητα, η δοκιμασία προσδιορισμού δόσης μπορεί να επαναληφθεί για τον προσδιορισμό της τιμής CV75 με μεγαλύτερη ακρίβεια. Επισημαίνεται ότι για τη μέτρηση της έκφρασης των CD86/CD54 μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο τρυβλία 24 κοιλότητων.

21. Ο μάρτυρας με διαλύτη/φορέα παρασκευάζεται σύμφωνα με τα όσα περιγράφονται στην παράγραφο 16. Ο θετικός μάρτυρας που χρησιμοποιείται στη μέθοδο h-CLAT είναι το DNCB (βλ. παράγραφο 11), για τον οποίο παρασκευάζονται αποθεματικά διαλύματα σε DMSO, τα οποία αραιώνονται σύμφωνα με τα όσα περιγράφονται στην παράγραφο 20. Το DNCB θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας για τη μέτρηση της έκφρασης των CD86/CD54 σε μία τελική συγκέντρωση στο τρυβλίο (συνήθως 4,0 µg/ml). Για την επίτευξη συγκέντρωσης DNCB 4,0 µg/ml στο τρυβλίο, παρασκευάζεται αποθεματικό διάλυμα DNCB 2 mg/ml σε DMSO, το οποίο αραιώνεται περαιτέρω 250x με θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ώστε να προκύψει διάλυμα εργασίας 8 µg/ml. Εναλλακτικά, η τιμή CV75 του DNCB, η οποία προσδιορίζεται σε κάθε εγκατάσταση δοκιμών, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως η συγκέντρωση θετικού μάρτυρα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι κατάλληλοι θετικοί μάρτυρες, εάν υπάρχουν διαθέσιμα ιστορικά δεδομένα από τα οποία μπορούν να προκύψουν συγκρίσιμα κριτήρια αποδοχής σειρών δοκιμών. Για τους θετικούς μάρτυρες, η τελική συγκέντρωση στο τρυβλίο δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 5 000 µg/ml (σε περίπτωση αλατούχου διαλύματος ή θρεπτικού μέσου) ή τα 1 000 µg/ml (σε περίπτωση DMSO). Τα κριτήρια αποδοχής σειρών δοκιμών είναι τα ίδια με τα κριτήρια που περιγράφονται για την υπό δοκιμή χημική ουσία (βλ. παράγραφο 29), με εξαίρεση το τελευταίο κριτήριο αποδοχής, δεδομένου ότι ο θετικός μάρτυρας υποβάλλεται σε δοκιμή σε μία μοναδική συγκέντρωση.

Εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

22. Για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία και μάρτυρα, για την επίτευξη πρόβλεψης απαιτείται η διεξαγωγή ενός πειράματος. Κάθε πείραμα περιλαμβάνει τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες σειρές δοκιμών για τη μέτρηση της έκφρασης των CD86/CD54 (βλ. παραγράφους 26-28). Κάθε ανεξάρτητη σειρά δοκιμών διεξάγεται σε διαφορετική ημέρα, ή την ίδια ημέρα υπό την προϋπόθεση ότι για κάθε σειρά δοκιμών: α) παρασκευάζονται ανεξάρτητα πρόσφατα αποθεματικά διαλύματα και διαλύματα εργασίας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και διαλύματα αντισωμάτων, και β) χρησιμοποιούνται ανεξαρτήτως συλλεχθέντα κύτταρα (δηλ. τα κύτταρα συλλέγονται από διαφορετικές φιάλες καλλιέργειας)· ωστόσο, τα κύτταρα μπορούν να προέρχονται από την ίδια ανακαλλιέργεια. Οι υπό δοκιμή χημικές

ουσίες και οι μάρτυρες που παρασκευάζονται ως διαλύματα εργασίας (500 μ l) αναμιγνύονται με 500 μ l εναιωρηθέντων κυττάρων (1×10^6 κύτταρα) σε αναλογία 1:1, και τα κύτταρα επωάζονται επί $24 \pm 0,5$ ώρες, σύμφωνα με τα όσα περιγράφονται στις παραγράφους 20 και 21. Σε κάθε σειρά δοκιμών αρκεί μία μοναδική δοκιμή για κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και του μάρτυρα, αφού μια πρόβλεψη λαμβάνεται από τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες σειρές δοκιμών.

Χρώση και ανάλυση κυττάρων

23. Μετά από $24 \pm 0,5$ ώρες έκθεσης, τα κύτταρα μεταφέρονται από το τρυβλίο 24 κοιλοτήτων σε σωληνάρια δειγμάτων, συλλέγονται με φυγοκέντρηση και, στη συνέχεια, εκπλένονται δύο φορές με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος χρώσης (μπορούν να γίνουν και άλλες πλύσεις εάν χρειάζεται). Μετά την έκπλυση, τα κύτταρα παρεμποδίζονται με 600 μ l παρεμποδιστικού διαλύματος [ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης που περιέχει 0,01 % κ.ό. σφαιρίνης (κλάσμα Cohn II, III, ανθρώπινο, SIGMA, #G2388-10G ή ισοδύναμο)] και επωάζονται στους 4°C επί 15 λεπτά. Μετά την παρεμπόδιση, τα κύτταρα διαχωρίζονται σε τρία κλάσματα 180 μ l σε τρυβλίο στρογγυλής βάσης 96 κοιλοτήτων ή μικροσωληνάριο.
24. Μετά τη φυγοκέντρηση, πραγματοποιείται χρώση των κυττάρων με 50 μ l σημασμένου με FITC αντισώματος αντι-CD86 ή αντι-CD54 ή αντισώματος ποντικού IgG1 (ισοτύπου) στους 4°C επί 30 λεπτά. Τα αντισώματα που περιγράφονται στο πρωτόκολλο h-CLAT DB-ALM αριθ. 158 (18) θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μετά από αραίωση 3:25 κ.ό. [για τον CD86 (BD-PharMingen, #555657, κλώνος: Fun-1)] ή 3:50 κ.ό. [για τον CD54 (DAKO, #F7143, κλώνος: 6.5B5) και το IgG1 (DAKO, #X0927)] με ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης. Οι εν λόγω συντελεστές αραίωσης αντισωμάτων καθορίστηκαν από τους φορείς ανάπτυξης της δοκιμής ως οι συντελεστές που παρέχουν τον βέλτιστο λόγο σήματος προς θόρυβο. Με βάση την εμπειρία των φορέων ανάπτυξης της δοκιμής, η ένταση του φθορισμού των αντισωμάτων είναι συνήθως παρεμφερής μεταξύ των διαφόρων παρτίδων. Ωστόσο, οι χρήστες μπορούν να εξετάσουν το ενδεχόμενο να τιτλοδοτήσουν τα αντισώματα υπό τις συνθήκες του δικού τους εργαστηρίου προκειμένου να καθορίσουν τις βέλτιστες συγκεντρώσεις προς χρήση. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα σημασμένα με φθοριοχρώματα αντισώματα αντι-CD86 και/ή αντι-CD54, εφόσον μπορεί να αποδειχθεί ότι αποδίδουν ανάλογα αποτελέσματα με αυτά των συζευγμένων με FITC αντισωμάτων, για παράδειγμα, μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 1.2. Πρέπει να σημειωθεί ότι η αλλαγή του κλώνου ή του προμηθευτή των αντισωμάτων, όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο h-CLAT DB-ALM αριθ. 158 (18), μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα. Αφού εκπλυθούν δύο φορές με 150 μ l ρυθμιστικού διαλύματος χρώσης, τα κύτταρα εναιωρούνται εκ νέου σε ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης (π.χ. 400 μ l) και προστίθεται το διάλυμα PI (π.χ. 20 μ l για την επίτευξη τελικής συγκέντρωσης 0,625 μ g/ml) ή άλλο διάλυμα δείκτη κυτταροτοξικότητας (βλ. παράγραφος 18). Τα επίπεδα έκφρασης των CD86 και CD54 αναλύονται με χρήση κυτταρομετρίας ροής.

ΛΕΛΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αξιολόγηση των δεδομένων

25. Η έκφραση των CD86 και CD54 αναλύεται με κυτταρομετρία ροής με τον διάλυο καταγραφής FL-1. Με βάση τον γεωμετρικό μέσο όρο έντασης φθορισμού (MFI), υπολογίζεται η σχετική ένταση φθορισμού (RFI) των CD86 και CD54 για τα κύτταρα θετικού μάρτυρα (ctrl) και τα υπό αγωγή με τη χημική ουσία κύτταρα σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$RFI = \frac{MFI \text{ κυττάρων υπό αγωγή} - MFI \text{ κυττάρων ισοτυπικού μάρτυρα υπό αγωγή}}{MFI \text{ κυττάρων μάρτυρα φορέα/διαλύτη} - MFI \text{ κυττάρων ισοτυπικού μάρτυρα φορέα/διαλύτη}} \times 100$$

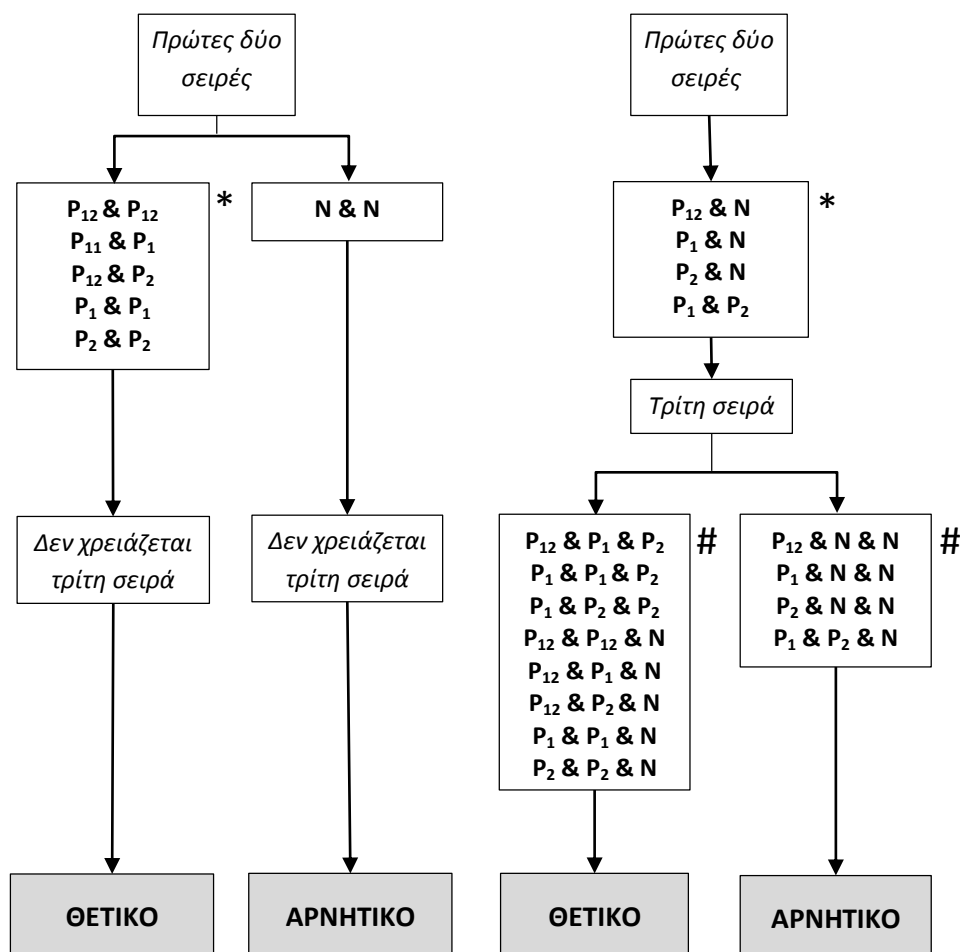
Η κυτταρική βιωσιμότητα από τα κύτταρα ισοτυπικού μάρτυρα (ctrl) [που υποβάλλονται σε χρώση με αντισώματα IgG1 (ισοτύπου) ποντικού] υπολογίζεται επίσης σύμφωνα με την εξίσωση που περιγράφεται στην παράγραφο 19.

Μοντέλο πρόβλεψης

26. Για τη μέτρηση της έκφρασης των CD86/CD54, κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία ελέγχεται σε τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες σειρές δοκιμών για να προκύψει μία συγκεκριμένη πρόβλεψη (ΘΕΤΙΚΗ ή ΑΡΝΗΤΙΚΗ). Μια πρόβλεψη h-CLAT θεωρείται ΘΕΤΙΚΗ εφόσον πληρούται τουλάχιστον μία από τις ακόλουθες προϋποθέσεις σε 2 από 2 ή τουλάχιστον σε 2 από 3 ανεξάρτητες σειρές δοκιμών, διαφορετικά η πρόβλεψη h-CLAT θεωρείται ΑΡΝΗΤΙΚΗ (σχήμα 1):
- η RFI του CD86 είναι ίση ή μεγαλύτερη από 150 % σε οποιαδήποτε ελεγχθείσα συγκέντρωση (με κυτταρική βιωσιμότητα ≥ 50 %),
 - η RFI του CD54 είναι ίση ή μεγαλύτερη από 200 % σε οποιαδήποτε ελεγχθείσα συγκέντρωση (με κυτταρική βιωσιμότητα ≥ 50 %).
27. Με βάση τα παραπάνω, εάν οι πρώτες δύο σειρές δοκιμών είναι αμφότερες θετικές για τον CD54 και/ή είναι αμφότερες θετικές για τον CD86, η πρόβλεψη h-CLAT θεωρείται ΘΕΤΙΚΗ και δεν χρειάζεται τρίτη σειρά δοκιμών. Παρομοίως, εάν οι πρώτες δύο σειρές δοκιμών είναι αρνητικές και για τους δύο δείκτες, η πρόβλεψη h-CLAT θεωρείται ΑΡΝΗΤΙΚΗ (λαμβάνομένων δεόντως υπόψη των πληροφοριών στην παράγραφο 30) χωρίς να χρειάζεται τρίτη σειρά δοκιμών. Εάν, ωστόσο, οι δύο πρώτες σειρές δοκιμών δε συμφωνούν για τουλάχιστον έναν από τους δείκτες (CD54 ή CD86), τότε χρειάζεται τρίτη σειρά δοκιμών και η τελική πρόβλεψη προκύπτει κατά πλειοψηφία (2 στις 3). Από αυτή την άποψη, θα πρέπει να επισημανθεί ότι εάν διεξάγονται δύο ανεξάρτητες σειρές δοκιμών, εκ των οποίων η μία είναι θετική μόνο για τον CD86 (στο εξής αναφερόμενη ως P₁) και η άλλη είναι θετική μόνο για τον CD54 (στο εξής αναφερόμενη ως P₂), απαιτείται η διεξαγωγή τρίτης σειράς δοκιμών. Εάν η εν λόγω τρίτη σειρά δοκιμών είναι αρνητική

και για τους δύο δείκτες (στο εξής αναφερόμενη ως N), η πρόβλεψη h-CLAT θεωρείται ΑΡΝΗΤΙΚΗ. Από την άλλη πλευρά, εάν η τρίτη σειρά δοκιμών είναι θετική για οποιονδήποτε από τους δύο δείκτες (P_1 ή P_2) ή και για τους δύο δείκτες (στο εξής αναφερόμενη ως P_{12}), η πρόβλεψη h-CLAT θεωρείται ΘΕΤΙΚΗ.

Σχήμα 1: Μοντέλο πρόβλεψης που χρησιμοποιείται στη μέθοδο h-CLAT. Οι προβλέψεις βάσει της μεθόδου h-CLAT θα πρέπει να εξετάζονται στο πλαίσιο ΙΑΤΑ και σύμφωνα με τις πληροφορίες στις παραγράφους 7 και 8 της γενικής εισαγωγής.



P_1 : σειρά δοκιμών με θετικό μόνο τον CD86· P_2 : σειρά δοκιμών με θετικό μόνο τον CD54· P_{12} : σειρά δοκιμών με θετικούς αμφότερους τους CD86 και CD54· N: σειρά δοκιμών χωρίς θετικό ούτε τον CD86 ούτε τον CD54.

*Εντός των πλαισίων παρουσιάζονται οι σχετικοί συνδυασμοί αποτελεσμάτων από τις δύο πρώτες σειρές δοκιμών, ανεξαρτήτως της σειράς με την οποία μπορεί να λαμβάνονται.

#Εντός των πλαισίων παρουσιάζονται οι σχετικοί συνδυασμοί αποτελεσμάτων από τις τρεις σειρές δοκιμών με βάση τα

αποτελέσματα που ελήφθησαν από τις δύο πρώτες σειρές δοκιμών που παρουσιάζονται στο πλαίσιο ανωτέρω, χωρίς, ωστόσο, να αντικατοπτρίζουν τη σειρά με την οποία μπορεί να λαμβάνονται.

28. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες για τις οποίες η πρόβλεψη είναι ΘΕΤΙΚΗ με την h-CLAT, μπορούν να προσδιορίζονται, προαιρετικά, δύο τιμές αποτελεσματικών συγκεντρώσεων (EC), η τιμή EC150 για τον CD86 και η τιμή EC200 για τον CD54, δηλ. η συγκέντρωση στην οποία οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες επήγαγαν RFI 150 ή 200. Οι εν λόγω τιμές EC μπορούν δυνητικά να συμβάλουν στην εκτίμηση της ευαισθητοποιητικής ισχύος (9), όταν χρησιμοποιούνται σε ολοκληρωμένες προσεγγίσεις, όπως οι IATA (4) (5) (6) (7) (8). Μπορούν να υπολογιστούν βάσει των ακόλουθων εξισώσεων:

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

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

όπου :

A_{conc} είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση σε $\mu\text{g/ml}$ με RFI > 150 (CD86) ή 200 (CD54)

B_{conc} είναι η υψηλότερη συγκέντρωση σε $\mu\text{g/ml}$ με RFI > 150 (CD86) ή 200 (CD54)

A_{RFI} είναι η RFI στη χαμηλότερη συγκέντρωση με RFI > 150 (CD86) ή 200 (CD54)

B_{RFI} είναι η RFI στην υψηλότερη συγκέντρωση με RFI < 150 (CD86) ή 200 (CD54)

Για τον υπολογισμό των τιμών των EC150 και EC200 με μεγαλύτερη ακρίβεια, ενδέχεται να απαιτείται η διεξαγωγή τριών ανεξάρτητων σειρών δοκιμών για τη μέτρηση της έκφρασης των CD86/CD54. Στη συνέχεια, οι τελικές τιμές EC150 και EC200 προσδιορίζονται ως η διάμεση τιμή των EC που υπολογίστηκαν από τις τρεις ανεξάρτητες σειρές δοκιμών. Σε περίπτωση που μόνο δύο από τις τρεις ανεξάρτητες σειρές δοκιμών πληρούν τα κριτήρια θετικότητας (βλ. παραγράφους 26-27), υιοθετείται η υψηλότερη EC150 ή EC200 από τις δύο υπολογισθείσες τιμές.

Κριτήρια αποδοχής

29. Όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος h-CLAT, θα πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια αποδοχής (22) (27).

- Οι κυτταρικές βιωσιμότητες του θρεπτικού μέσου και των μαρτύρων με διαλύτη/φορέα θα πρέπει να υπερβαίνουν το 90 %.
- Στον μάρτυρα με διαλύτη/φορέα, οι τιμές RFI αμφοτέρων των CD86 και CD54 δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τα κριτήρια χαρακτηρισμού ως θετικών (CD86 RFI $\geq$ 150 % και CD54 RFI $\geq$ 200 %). Οι τιμές RFI του μάρτυρα με διαλύτη/φορέα υπολογίζονται με χρήση του τύπου που περιγράφεται στην παράγραφο 25 [το «MFI χημικής ουσίας» θα πρέπει να αντικατασταθεί από το «MFI διαλύτη/φορέα», και το «MFI διαλύτη/φορέα» θα πρέπει να αντικατασταθεί από το «MFI μάρτυρα (θρεπτικού μέσου)»].

- Για τους μάρτυρες θρεπτικού μέσου και διαλύτη/φορέα, ο λόγος MFI τόσο του CD86 όσο και του CD54 προς τον ισοτυπικό μάρτυρα θα πρέπει να είναι $> 105 \%$.
 - Στον θετικό μάρτυρα (DNCB), οι τιμές RFI για τους CD86 και CD54 θα πρέπει να πληρούν τα κριτήρια θετικότητας (CD86 RFI ≥ 150 και CD54 RFI ≥ 200), και η κυτταρική βιωσιμότητα θα πρέπει να υπερβαίνει το 50% .
 - Για την υπό δοκιμή χημική ουσία, η κυτταρική βιωσιμότητα θα πρέπει να υπερβαίνει το 50% σε τουλάχιστον τέσσερις ελεγχθείσες συγκεντρώσεις σε κάθε σειρά δοκιμών.
30. Αρνητικά αποτελέσματα είναι αποδεκτά μόνο για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που παρουσιάζουν κυτταρική βιωσιμότητα κάτω από 90% στην υψηλότερη ελεγχθείσα συγκέντρωση (δηλ. $1,2 \times CV75$, σύμφωνα με το σχήμα διαδοχικών αραιώσεων που περιγράφεται στην παράγραφο 20). Εάν η κυτταρική βιωσιμότητα σε $1,2 \times CV75$ είναι ίση ή μεγαλύτερη από 90% , το αρνητικό αποτέλεσμα θα πρέπει να απορρίπτεται. Σε αυτή την περίπτωση, συνιστάται η βελτιστοποίηση των επιλεγμένων δόσεων μέσω επανάληψης του προσδιορισμού της CV75. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι όταν ως μέγιστη συγκέντρωση δοκιμής μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας χρησιμοποιούνται τα $5\,000\ \mu\text{g/ml}$ σε αλατούχο διάλυμα (ή σε θρεπτικό μέσο ή άλλους διαλύτες/φορείς), τα $1\,000\ \mu\text{g/ml}$ σε DMSO ή η υψηλότερη διαλυτή συγκέντρωση, ένα αρνητικό αποτέλεσμα είναι αποδεκτό ακόμη κι αν η κυτταρική βιωσιμότητα υπερβαίνει το 90% .

Έκθεση δοκιμής

31. Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία.

Υπό δοκιμή χημική ουσία

Μονοσυστατική ουσία

- ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,
- φυσική εμφάνιση, Log Kow, υδατοδιαλυτότητα, διαλυτότητα σε DMSO, μοριακό βάρος και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, εφόσον είναι διαθέσιμα,
- καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,
- κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),
- ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,
- συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,
- αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγμα

- χαρακτηρισμός, στο μέτρο του δυνατού, π.χ. χημική ταυτότητα (βλ. ανωτέρω), καθαρότητα, ποσότητα και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες (βλ. ανωτέρω) των συστατικών, εφόσον είναι διαθέσιμα,
- φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα, διαλυτότητα σε DMSO και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, εφόσον είναι διαθέσιμα,
- μοριακό βάρος ή φαινόμενο μοριακό βάρος στην περίπτωση των μειγμάτων/πολυμερών γνωστής σύνθεσης ή άλλες πληροφορίες που έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης,
- κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),
- ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,
- συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,
- αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Έλεγχοι

Θετικός μάρτυρας

- ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,
- φυσική εμφάνιση, Log K_{ow} , υδατοδιαλυτότητα, διαλυτότητα σε DMSO, μοριακό βάρος και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, στο μέτρο του δυνατού και ανάλογα με την περίπτωση,
- καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,
- κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),
- ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,
- συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,
- παραπομπή σε ιστορικά αποτελέσματα θετικών μαρτύρων που καταδεικνύουν την εφαρμογή κατάλληλων κριτηρίων αποδοχής των μετρήσεων, εάν ισχύει.

Αρνητικός μάρτυρας και μάρτυρας με διαλύτη/φορέα

- ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

- καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,
- φυσική εμφάνιση, μοριακό βάρος, καθώς και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, σε περίπτωση χρήσης άλλου διαλύτη/φορέα εκτός εκείνων που αναφέρονται στην κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών και εφόσον είναι διαθέσιμα,
- συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,
- αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Συνθήκες δοκιμής

- όνομα και διεύθυνση του χορηγού, της εγκατάστασης δοκιμών και του διευθυντή της μελέτης,
- περιγραφή της χρησιμοποιηθείσας δοκιμής,
- κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε, συνθήκες φύλαξης και προέλευσή της (π.χ. εγκατάσταση προέλευσης),
- χρησιμοποιηθείσα μέθοδος κυτταρομετρίας ροής (π.χ. μοντέλο), περιλαμβανομένων των χρησιμοποιηθέντων οργάνων, σφαιρίνης, αντισωμάτων και δεικτών κυτταροτοξικότητας,
- η διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για να αποδειχθεί η τεχνική ικανότητα του εργαστηρίου να διεξάγει τη δοκιμή μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας, και η διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για να αποδειχθεί η διαχρονική αναπαραγωγιμότητα της διεξαγωγής της δοκιμής, π.χ. ιστορικά δεδομένα για μάρτυρες και/ή ιστορικά δεδομένα ελέγχων δραστηριότητας.

Κριτήρια αποδοχής της δοκιμής

- κυτταρική βιωσιμότητα, τιμές MFI και RFI που ελήφθησαν με τον μάρτυρα με διαλύτη/φορέα σε σύγκριση με τα αποδεκτά πεδία τιμών,
- κυτταρική βιωσιμότητα και τιμές RFI που ελήφθησαν με τον θετικό μάρτυρα σε σύγκριση με τα αποδεκτά πεδία τιμών,
- κυτταρική βιωσιμότητα όλων των ελεγχθεισών συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Διαδικασία δοκιμής

- αριθμός σειρών δοκιμών που χρησιμοποιήθηκαν,
- συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, χρόνος εφαρμογής και έκθεσης που χρησιμοποιήθηκε (εάν διαφέρει από τον συνιστώμενο),
- διάρκεια της έκθεσης (εφόσον διαφέρει από τη συνιστώμενη),

- περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αξιολόγησης και λήψης αποφάσεων,
- περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμής.

Αποτελέσματα

- δεδομένα υπό μορφή πίνακα, περιλαμβανομένης της CV75 (κατά περίπτωση), των επιμέρους γεωμετρικών τιμών MFI, RFI, των τιμών κυτταρικής βιωσιμότητας, των τιμών EC150/EC200 (κατά περίπτωση) που υπολογίστηκαν για την υπό δοκιμή χημική ουσία και για τον θετικό μάρτυρα σε κάθε σειρά δοκιμών, και ένδειξη της κατάταξης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σύμφωνα με το μοντέλο πρόβλεψης,
- περιγραφή κάθε άλλης σχετικής παρατήρησης, κατά περίπτωση.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

- εξέταση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με τη μέθοδο δοκιμών h-CLAT,
- εξέταση των αποτελεσμάτων δοκιμής στο πλαίσιο της IATA, εάν υπάρχουν σχετικές πληροφορίες.

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (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. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: <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). Διαθέσιμο στη διεύθυνση: <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 Accessible at: <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 tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim. Sci.* 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), 23pp. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: <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 pp.
- (22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Μέρος 1: Series on Testing and Assessment No. Series on Testing and Assessment No 168. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [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)
- (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. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: 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.

Προσάρτημα 1.1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της δοκιμής και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της δοκιμής και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας δοκιμής (21).

AOP (Adverse Outcome Pathway): πορεία δυσμενούς έκβασης: αλληλουχία συμβάντων, από τη χημική δομή της στοχευόμενης χημικής ουσίας ή ομάδας ομοειδών χημικών ουσιών και το μοριακό εναρκτήριο συμβάν μέχρι την εξεταζόμενη έκβαση *in vivo* (22).

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

CV75: η εκτιμώμενη συγκέντρωση που παρουσιάζει κυτταρική βιωσιμότητα 75 %.

EC150: οι συγκεντρώσεις που παρουσιάζουν την τιμή RFI 150 για την έκφραση του CD86

EC200: οι συγκεντρώσεις που παρουσιάζουν την τιμή RFI 200 για την έκφραση του CD54

Κυτταρομετρία ροής: κυτταρομετρική τεχνική κατά την οποία κύτταρα εναιωρημένα εντός υγρού διασχίζουν ένα-ένα την εστία μιας φωτεινής δέσμης διέγερσης, η οποία σκεδάζεται με τρόπους χαρακτηριστικούς των κυττάρων και των συστατικών τους· τα κύτταρα σημαίνονται συχνά με φθορίζοντες δείκτες οι οποίοι πρώτα απορροφούν και κατόπιν επανεκπέμπουν το φως σε διαφορετική συχνότητα.

Επικινδυνότητα: εγγενής ιδιότητα ενός παράγοντα ή μιας κατάστασης που μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις όταν ένας οργανισμός, ένα σύστημα ή ένας (υπο)πληθυσμός εκτίθεται στον παράγοντα.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση: δομημένη προσέγγιση που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας (δυναμικό), τον χαρακτηρισμό της επικινδυνότητας (ισχύς) και/ή την εκτίμηση της ασφάλειας (δυναμικό/ισχύς και έκθεση) μιας χημικής ουσίας ή ομάδας χημικών ουσιών, στην οποία ενσωματώνονται και σταθμίζονται στρατηγικά όλα τα σχετικά δεδομένα, με σκοπό την τροφοδότηση κανονιστικών αποφάσεων σχετικά με τη δυνητική επικινδυνότητα και/ή τον κίνδυνο και/ή την ανάγκη για περαιτέρω στοχευμένες και, ως εκ τούτου, ελάχιστες δοκιμές.

Μάρτυρας θρεπτικού μέσου: πανομοιότυπο δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και δεν υποβάλλεται σε αγωγή. Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή μαζί με τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία και με άλλα δείγματα μάρτυρες, ούτως ώστε να διαπιστώνεται αν ο διαλύτης/φορέας αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Μείγμα: ένα μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες.

Μονοσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας ένα κύριο συστατικό περιέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 80 % κ.β.

Πολυσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας περισσότερα από ένα κύρια συστατικά περιέχονται σε συγκέντρωση ≥ 10 % κ.β. και < 80 % κ.β. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα μεταποιητικών διεργασιών. Η διαφορά μεταξύ μείγματος και πολυσυστατικής ουσίας είναι ότι το μείγμα λαμβάνεται με ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, χωρίς χημική αντίδραση. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα χημικών αντιδράσεων.

Θετικός μάρτυρας: πανομοιότυπο δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με ουσία που είναι γνωστό ότι προκαλεί θετική απόκριση. Για να διασφαλίζεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της θετικής απόκρισης δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

Αβιοτικά προαπτένια: χημικές ουσίες που καθίστανται ευαισθητοποιητικές μέσω αβιοτικού μετασχηματισμού

Μεταβολικά προαπτένια: χημικές ουσίες που χρειάζονται ενζυμική ενεργοποίηση για να εκδηλώσουν το δυναμικό δερματικής ευαισθητοποίησής τους

Σχετική ένταση φθορισμού (RFI): οι σχετικές τιμές του γεωμετρικού μέσου όρου έντασης φθορισμού (MFI) σε κύτταρα που υποβάλλονται σε αγωγή σε με υπό δοκιμή χημική ουσία σε σύγκριση με την MFI σε κύτταρα που υποβάλλονται σε αγωγή με διαλύτη/φορέα.

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της δοκιμής με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή είναι αρμόζουσα και χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμή μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της δοκιμής (21).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια δοκιμή μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, καθώς και της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας (21).

Σειρά δοκιμών: η σειρά περιλαμβάνει μία ή περισσότερες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που υποβάλλονται σε δοκιμή ταυτόχρονα με μάρτυρα με διαλύτη/φορέα και θετικό μάρτυρα.

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, και είναι σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των δοκιμών (21).

Ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης: αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων που περιέχει 0,1 % αλβουμίνη βόειου ορού.

Μάρτυρας με διαλύτη/φορέα: δείγμα που δεν υποβάλλεται σε αγωγή και περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής, εκτός της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, αλλά περιλαμβανομένου του διαλύτη/φορέα που χρησιμοποιείται. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της βασικής απόκρισης των δειγμάτων που υποβάλλονται σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία διαλυμένη ή σταθερώς διεσπαρμένη στον ίδιο διαλύτη/φορέα. Όταν το εν λόγω δείγμα υποβάλλεται σε δοκιμή με παράλληλο μάρτυρα θρεπτικού μέσου, καταδεικνύει επίσης αν ο διαλύτης/φορέας αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, και είναι σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των δοκιμών (21).

Ουσία: ένα χημικό στοιχείο και οι ενώσεις του σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητά του, καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με χρήση της παρούσας μεθόδου.

Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) (GHS του ΟΗΕ): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικής επικινδυνότητας και επικινδυνότητας για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα στοιχεία γνωστοποίησης, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, με τα οποία γνωστοποιούνται πληροφορίες σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (23).

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

Έγκυρη δοκιμή: δοκιμή που θεωρείται επαρκούς καταλληλότητας και αξιοπιστίας για συγκεκριμένο σκοπό και βασίζεται σε επιστημονικά τεκμηριωμένες αρχές. Μια δοκιμή δεν είναι ποτέ έγκυρη με την απόλυτη σημασία του όρου, αλλά μόνο σε σχέση με καθορισμένο σκοπό (21).

Προσάρτημα 1.2

ΟΥΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

Πριν εντάξουν στην καθημερινή πρακτική τη δοκιμή που περιγράφεται στο παρόν προσάρτημα της μεθόδου δοκιμών B.71, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα επιτυγχάνοντας σωστά την αναμενόμενη πρόβλεψη βάσει της μεθόδου h-CLAT για τις 10 συνιστώμενες ουσίες του πίνακα 1, καθώς και τιμές CV75, EC150 και EC200 εντός του αντίστοιχου εύρους τιμών αναφοράς για τουλάχιστον 8 από τις 10 ουσίες ελέγχου ικανότητας. Αυτές οι ουσίες ελέγχου ικανότητας επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικές του φάσματος αποκρίσεων από τις πηγές κινδύνου δερματικής ευαισθητοποίησης. Άλλα κριτήρια επιλογής ήταν ότι οι ουσίες θα πρέπει να είναι εμπορικά διαθέσιμες, και ότι θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα *in vivo* δεδομένα αναφοράς υψηλής ποιότητας καθώς και *in vitro* δεδομένα υψηλής ποιότητας που προκύπτουν με τη μέθοδο h-CLAT. Επίσης, για τη μέθοδο h-CLAT υπάρχουν διαθέσιμα δημοσιευμένα δεδομένα αναφοράς (3) (14).

Πίνακας 1: Συνιστώμενες ουσίες για την απόδειξη τεχνικής ικανότητας όσον αφορά τη μέθοδο h-CLAT

Ουσίες ελέγχου ικανότητας	Αριθμός CAS	Φυσική κατάσταση	Πρόβλεψη <i>in vivo</i> ¹	CV75 Πεδίο τιμών αναφοράς σε $\mu\text{g/ml}^2$	Αποτελέσματα h-CLAT για τον CD86 (πεδίο τιμών αναφοράς EC150 σε $\mu\text{g/ml}$) ²	Αποτελέσματα h-CLAT για τον CD54 (πεδίο τιμών αναφοράς EC200 σε $\mu\text{g/ml}$) ²
2,4-Δινιτροχλωροβενζόλιο	97-00-7.	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (εξαιρετικά ισχυρό)	2-12	Θετικό (0,5-10)	Θετικό (0,5-15)
4-Φαινυλενοδιαμίνη	106-50-3	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (ισχυρό)	5-95	Θετικό (<40)	Αρνητικό (>1,5) ³
Θειικό νικέλιο	10101-97-0.	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (μετρίως ισχυρό)	30-500	Θετικό (<100)	Θετικό (10-100)
2-Μερκαπτοβενζοθειαζόλιο	149-30-4.	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (μετρίως ισχυρό)	30-400	Αρνητικό (>10) ³	Θετικό (10-140)
R(+)-Λεμονένιο	5989-27-5	Υγρό	Ευαισθητοποιητικό (ασθενές)	>20	Αρνητικό (>5) ³	Θετικό (<250)
Ιμιδαζολιδινουρία	39236-46-9.	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (ασθενές)	25-100	Θετικό (20-90)	Θετικό (20-75)
Ισοπροπανόλη	67-63-0	Υγρό	Μη ευαισθητοποιητικό	>5000	Αρνητικό (>5000)	Αρνητικό (>5000)
Γλυκερίνη	56-81-5	Υγρό	Μη ευαισθητοποιητικό	>5000	Αρνητικό (>5000)	Αρνητικό (>5000)
Γαλακτικό οξύ	50-21-5	Υγρό	Μη ευαισθητοποιητικό	1500-5000	Αρνητικό (>5000)	Αρνητικό (>5000)
4-Αμινοβενζοϊκό οξύ	150-13-0	Στερεό	Μη ευαισθητοποιητικό	>1000	Αρνητικό (>1000)	Αρνητικό (>1000)

Συντομογραφίες: Αριθ. CAS = Αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstract Service

¹ Η πρόβλεψη για την επικινδυνότητα *in vivo* (και την ισχύ) βασίζεται σε δεδομένα από LLNA (3) (14). Η *in vivo* ισχύς συνάγεται με εφαρμογή των κριτηρίων που έχει προτείνει το ECETOC (24).

² Βάσει των ιστορικών τιμών που παρατηρήθηκαν (13) (25).

³ Καθώς τα ιστορικά αποτελέσματα για τον εν λόγω δείκτη είναι στην πλειονότητά τους αρνητικά, αναμένεται, κατά βάση, αρνητικό αποτέλεσμα. Το παρεχόμενο πεδίο τιμών καθορίστηκε με βάση τα ελάχιστα ιστορικά θετικά αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν. Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, η τιμή EC θα πρέπει να περιλαμβάνεται εντός του αναφερθέντος πεδίου τιμών αναφοράς.

Προσάρτημα 2

ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ *IN VITRO*: ΔΟΚΙΜΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ U937 (U-SENS™)

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

1. Η δοκιμή U-SENS™ χρησιμεύει στον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολών στην έκφραση ενός δείκτη της κυτταρικής επιφάνειας που συνδέεται με τη διεργασία ενεργοποίησης των μονοκυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων (DC) (τον δείκτη CD86), στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά ιστιοκυτταρικού λεμφώματος, κατόπιν έκθεσης σε ευαισθητοποιητικά (1). Στη συνέχεια, τα μετρηθέντα επίπεδα έκφρασης του δείκτη CD86 στην κυτταρική σειρά U937 χρησιμοποιείται για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος.
2. Η δοκιμή U-SENS™ έχει αξιολογηθεί στο πλαίσιο μελέτης επικύρωσης (2) που συντόνισε η L'Oréal, και υποβλήθηκε σε επακόλουθη αξιολόγηση από ομοτίμους από τη Συμβουλευτική Επιστημονική Επιτροπή (ESAC) του εργαστηρίου αναφοράς της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τις εναλλακτικές μεθόδους αντί των δοκιμών σε ζώα (EURL ECVAM) (3). Αφού έλαβε υπόψη όλα τα διαθέσιμα στοιχεία και τις απόψεις των ρυθμιστικών αρχών και των ενδιαφερόμενων μερών, το EURL ECVAM (4) συνέστησε τη χρήση της U-SENS™ στο πλαίσιο IATA για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών με σκοπό την ταξινόμηση και επισήμανση της επικινδυνότητας. Στο έγγραφο καθοδήγησης για την αναφορά των δομημένων προσεγγίσεων αναφορικά με την ολοκλήρωση δεδομένων και τις επιμέρους πηγές πληροφοριών των IATA για την ευαισθητοποίηση του δέρματος, ο ΟΟΣΑ εξετάζει σειρά περιπτώσιολογικών μελετών που περιγράφουν διάφορες στρατηγικές δοκιμών και μοντέλων πρόβλεψης. Μία από τις διαφορετικές καθορισμένες προσεγγίσεις βασίζεται στη δοκιμασία U-SENS (5). Παραδείγματα της χρήσης των δεδομένων της U-SENS™ σε συνδυασμό με άλλες πληροφορίες, περιλαμβανομένων των ιστορικών δεδομένων και των υπαρχόντων έγκυρων δεδομένων για τον άνθρωπο (6), έχουν επίσης αναφερθεί σε άλλες δημοσιευμένες εργασίες (4) (5) (7).
3. Διαπιστώθηκε ότι η δοκιμή U-SENS™ μπορεί να εφαρμοστεί σε εργαστήρια που διαθέτουν εμπειρία στη χρήση τεχνικών κυτταροκαλλιέργειας και ανάλυσης κυτταρομετρίας ροής. Ο βαθμός αναπαραγωγιμότητας των προβλέψεων που αναμένεται να παρέχει η δοκιμή είναι της τάξης του 90 % και του 84 % ενδοεργαστηριακά και διεργαστηριακά, αντίστοιχα (8). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη επικύρωσης (8) και άλλες δημοσιευμένες μελέτες (1) υποδεικνύουν συνολικά ότι, σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της LLNA, η ορθότητα της διάκρισης μεταξύ

ευαισθητοποιητικών (κατηγορία 1 κατά GHS του OHE / κανονισμό CLP) και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος είναι 86 % (N=166), με ευαισθησία 91 % (118/129) και ειδικότητα 65 % (24/37). Σε σύγκριση με τα αποτελέσματα για τον άνθρωπο, η ορθότητα της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών (κατηγορία 1 κατά GHS του OHE / κανονισμό CLP) και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος είναι 77 % (N=101), με ευαισθησία 100 % (58/58) και ειδικότητα 47% (20/43). Οι ψευδοαρνητικές προβλέψεις με την U-SENS™ σε σύγκριση με την LLNA είναι πιθανότερο να προκύπτουν με χημικές ουσίες που εμφανίζουν χαμηλή έως μέτρια ισχύ ευαισθητοποίησης του δέρματος (υποκατηγορία 1B κατά GHS του OHE / κανονισμό CLP) έναντι χημικών ουσιών που εμφανίζουν υψηλή ισχύ ευαισθητοποίησης του δέρματος (υποκατηγορία 1A κατά GHS του OHE / κανονισμό CLP) (1) (8) (9). Συνολικά, τα στοιχεία αυτά δείχνουν τη χρησιμότητα της δοκιμής U-SENS™ ως εργαλείου που συμβάλλει στον προσδιορισμό της επικινδυνότητας ευαισθητοποίησης του δέρματος. Ωστόσο, οι τιμές ορθότητας που παρέχονται εδώ για την U-SENS™ ως αυτοτελή δοκιμή είναι απλώς ενδεικτικές, δεδομένου ότι η δοκιμή θα πρέπει να εξετάζεται σε συνδυασμό με άλλες πηγές πληροφοριών στο πλαίσιο IATA και σύμφωνα με τις πληροφορίες στις παραγράφους 7 και 8 της γενικής εισαγωγής. Επιπλέον, κατά την αξιολόγηση των μεθόδων δοκιμών ευαισθητοποίησης του δέρματος χωρίς χρήση ζώων, θα πρέπει να μη λησμονείται ότι η δοκιμασία LLNA, καθώς και άλλες δοκιμές σε ζώα, ενδέχεται να μην αντικατοπτρίζουν πλήρως την κατάσταση στον άνθρωπο.

4. Βάσει των επί του παρόντος διαθέσιμων δεδομένων, διαπιστώθηκε ότι η δοκιμή U-SENS™ μπορεί να εφαρμόζεται σε υπό δοκιμή χημικές ουσίες (περιλαμβανομένων των συστατικών καλλυντικών προϊόντων, π.χ. συντηρητικών, επιφανειοδραστικών, δραστικών ουσιών, χρωστικών) που καλύπτουν ποικιλία οργανικών λειτουργικών ομάδων, φυσικοχημικών ιδιοτήτων, επιπέδων ισχύος ευαισθητοποίησης του δέρματος (όπως καθορίζονται στις *in vivo* μελέτες) καθώς και το φάσμα μηχανισμών αντίδρασης που είναι γνωστό ότι συνδέονται με την ευαισθητοποίηση του δέρματος (δηλ. δέκτης Michael, σχηματισμός βάσης Schiff, παράγοντας μεταφοράς ακυλίου, πυρηνόφιλη διμοριακή υποκατάσταση [SN2], ή πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση [SNAr]) (1) (8) (9) (10). Η δοκιμή U-SENS™ είναι εφαρμόσιμη σε υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι διαλυτές ή σχηματίζουν σταθερή διασπορά (δηλ. κολλοειδές ή εναιώρημα στο οποίο η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν καθιζάνει ούτε διαχωρίζεται από τον διαλύτη/φορέα σε διαφορετικές φάσεις) σε κατάλληλο διαλύτη/φορέα (βλ. παράγραφο 13). Οι χημικές ουσίες του συνόλου δεδομένων που είχαν χαρακτηριστεί αβιοτικά προαπτένια (δηλαδή ουσίες που ενεργοποιούνται με οξείδωση) ή μεταβολικά προαπτένια (δηλαδή ουσίες που χρειάζονται ενζυμική ενεργοποίηση, π.χ. μέσω των ενζύμων P450) προβλέφθηκαν σωστά με τη δοκιμή U-SENS™ (1) (10). Ουσίες που προκαλούν ρήξη της μεμβράνης μπορούν να οδηγήσουν σε ψευδοθετικά αποτελέσματα λόγω μη ειδικής αύξησης της έκφρασης του CD86, καθώς 3 από τα 7 ψευδοθετικά αποτελέσματα σε σχέση με την *in vivo* ταξινόμηση αναφοράς αφορούσαν επιφανειοδραστικές ουσίες (1). Δεδομένων των παραπάνω, τα θετικά

αποτελέσματα με επιφανειοδραστικά θα πρέπει να εξετάζονται με επιφύλαξη, ενώ τα αρνητικά αποτελέσματα με επιφανειοδραστικές ουσίες μπορούν να χρησιμοποιούνται για την υποστήριξη του χαρακτηρισμού της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ως μη ευαισθητοποιητικής. Παρότι οι φθορίζουσες ουσίες μπορούν να αξιολογηθούν με την U-SENS™ (1), οι ισχυρά φθορίζουσες ουσίες που εκπέμπουν στο ίδιο μήκος κύματος με την ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) ή το ιωδιούχο προπίδιο (PI) παρεμποδίζουν την κυτταρομετρική ανίχνευση ροής και, ως εκ τούτου, δεν μπορούν να αξιολογηθούν σωστά με χρήση συζευγμένων με FITC αντισωμάτων (δυνητικά ψευδοαρνητικά) ή PI (μη μετρήσιμη βιωσιμότητα). Σε αυτή την περίπτωση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλα σημασμένα με φθοριοχρώματα αντισώματα ή άλλοι δείκτες κυτταροτοξικότητας, αντίστοιχα, εφόσον μπορεί να καταδειχθεί ότι παρέχουν ανάλογα αποτελέσματα με τα σημασμένα με FITC αντισώματα ή το PI (βλ. παράγραφο 18) π.χ. μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 2.2. Υπό το πρίσμα των ανωτέρω, τα θετικά αποτελέσματα με επιφανειοδραστικές ουσίες και τα αρνητικά αποτελέσματα με ισχυρά φθορίζουσες ουσίες θα πρέπει να ερμηνεύονται στο πλαίσιο των αναφερόμενων περιορισμών και σε συνάρτηση με άλλες πηγές πληροφοριών στο πλαίσιο IATA. Εάν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η δοκιμή U-SENS™ δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε άλλες ειδικές κατηγορίες υπό δοκιμή χημικών ουσιών, η δοκιμή δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τις συγκεκριμένες κατηγορίες.

5. Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, η μέθοδος U-SENS™ υποστηρίζει τη διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος. Ωστόσο, μπορεί ενδεχομένως να συμβάλει στην εκτίμηση της ευαισθητοποιητικής ισχύος, όταν χρησιμοποιείται σε ολοκληρωμένες προσεγγίσεις, όπως οι IATA. Απαιτούνται πάντως περισσότερες εργασίες, κατά προτίμηση με βάση δεδομένα για τον άνθρωπο, για να διαπιστωθεί ο τρόπος με τον οποίο τα αποτελέσματα της U-SENS™ θα μπορούσαν ενδεχομένως να τροφοδοτήσουν την εκτίμηση της ευαισθητοποιητικής ισχύος.
6. Οι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 2.1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Η δοκιμή U-SENS™ είναι μια *in vitro* δοκιμασία με την οποία προσδιορίζονται ποσοτικά οι μεταβολές της έκφρασης του δείκτη κυτταρικής επιφάνειας CD86 σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά ιστιοκυτταρικού λεμφώματος, στα κύτταρα U937, μετά από έκθεση 45 ± 3 ωρών στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Ο επιφανειακός δείκτης CD86 αποτελεί τυπικό δείκτη ενεργοποίησης των U937. Ο δείκτης CD86 είναι γνωστό ότι αποτελεί συνδιεγερτικό μόριο που μπορεί να μιμείται τη μονοκυτταρική ενεργοποίηση, η οποία παίζει κρίσιμο ρόλο στην προδιέγερση των T κυττάρων. Οι μεταβολές της έκφρασης του δείκτη κυτταρικής επιφάνειας CD86 μετρώνται με κυτταρομετρία ροής μετά από χρώση

των κυττάρων συνήθως με αντισώματα σημασμένα με ισοθιοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC). Ταυτόχρονα, διεξάγεται επίσης μέτρηση της κυτταροτοξικότητας (π.χ. με χρήση PI) προκειμένου να διαπιστωθεί εάν αυξάνεται η έκφραση του δείκτη κυτταρικής επιφάνειας CD86 σε υποκυτταροτοξικές συγκεντρώσεις. Ο δείκτης διέγερσης (S.I.) του δείκτη κυτταρικής επιφάνειας CD86 υπολογίζεται σε σύγκριση με τον μάρτυρα με διαλύτη/φορέα και χρησιμοποιείται στο μοντέλο πρόβλεψης (βλ. παράγραφο 19) για να υποστηριχθεί η διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών ουσιών.

ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

8. Πριν χρησιμοποιήσουν στην καθημερινή πρακτική τη δοκιμή που περιγράφεται στο παρόν προσάρτημα της μεθόδου δοκιμών B.71, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα, χρησιμοποιώντας τις 10 ουσίες ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 2.2 σύμφωνα με τις ορθές πρακτικές *in vitro* μεθόδων (11). Επιπλέον, οι χρήστες της δοκιμής θα πρέπει να διατηρούν βάση ιστορικών δεδομένων με τα δεδομένα που προκύπτουν από τους ελέγχους δραστηριότητας (βλ. παράγραφο 11) και με τους θετικούς μάρτυρες και τους μάρτυρες με διαλύτη/φορέα (βλ. παραγράφους 15-16), και θα πρέπει να χρησιμοποιούν τα εν λόγω δεδομένα για να βεβαιώνονται για τη διαχρονική αναπαραγωγιμότητα της δοκιμής στο εργαστήριό τους.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

9. Η παρούσα δοκιμή βασίζεται στο πρωτόκολλο αριθ. 183 της υπηρεσίας βάσης δεδομένων U-SENS™ για τις εναλλακτικές μεθόδους αντί των πειραμάτων σε ζώα (DB-ALM) (12). Κατά την καθιέρωση και τη χρήση της δοκιμής U-SENS™ στο εργαστήριο, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι τυποποιημένες διαδικασίες λειτουργίας (SOP). Μπορεί να χρησιμοποιείται αυτοματοποιημένο σύστημα για τη διεξαγωγή της U-SENS™, εφόσον μπορεί να αποδειχθεί ότι παράγει ανάλογα αποτελέσματα, για παράδειγμα μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 2.2. Στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται τα βασικά στοιχεία και διαδικασίες για τη δοκιμή U-SENS™.

Προπαρασκευή των κυττάρων

10. Για την διεξαγωγή της δοκιμής U-SENS™ θα πρέπει να χρησιμοποιείται η ανθρώπινη κυτταρική σειρά ιστιοκυτταρικού λεμφώματος U937 (13). Τα κύτταρα (κλώνος CRL1593.2) θα πρέπει να λαμβάνονται από επαρκώς εξειδικευμένη τράπεζα κυττάρων, όπως η American Type Culture Collection.
11. Τα κύτταρα U937 καλλιεργούνται στους 37°C και σε ατμόσφαιρα με υγρανση και 5 % CO₂ σε θρεπτικό μέσο RPMI-1640, συμπληρωμένο με 10 % ορού εμβρύων μύσων (FCS), 2 mM L-γλουταμίνης, 100 μονάδες/ml πενικιλίνης και 100 μg/ml στρεπτομυκίνης (πλήρες

θρεπτικό μέσο). Τα κύτταρα U937 ανακαλλιεργούνται συνήθως κάθε 2-3 ημέρες σε

π

υ

κ

ν

ό

τ

η

τ

α

1

,

5

έ

ω

ς

3

12. Όσον αφορά τη δοκιμή, τα κύτταρα U937 εμβολιάζονται σε πυκνότητα είτε 3×10^5 κύτταρα/ml είτε 6×10^5 κύτταρα/ml, και προκαλλιεργούνται σε φιάλες καλλιέργειας επί 2 ημέρες ή επί 1 ημέρα αντίστοιχα. Μπορούν να εφαρμοστούν και συνθήκες προκαλλιεργειας διαφορετικές από εκείνες που περιγράφονται ανωτέρω, εφόσον αυτό τεκμηριώνεται επαρκώς επιστημονικά και εφόσον μπορεί να αποδειχθεί ότι αποδίδουν ανάλογα αποτελέσματα, για παράδειγμα μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 2.2. Την ημέρα της δοκιμής, κύτταρα που έχουν συλλεχθεί από την φιάλη καλλιέργειας εναιωρούνται εκ νέου με πρόσφατα παρασκευασθέν θρεπτικό μέσο καλλιέργειας σε 5×10^5 κύτταρα/ml. Στη συνέχεια, τα κύτταρα κατανέμονται σε τρυβλίο επίπεδης βάσης 96 κοιλοτήτων με 100 μ l (τελική κυτταρική πυκνότητα $0,5 \times 10^5$ κύτταρα/κοιλότητα).

Προετοιμασία των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

13. Πριν από τη δοκιμή διεξάγεται αξιολόγηση της διαλυτότητας. Για αυτόν τον σκοπό, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες διαλύονται ή διασπείρονται σταθερώς σε συγκέντρωση 50 mg/ml σε πλήρες θρεπτικό μέσο, ως πρώτη επιλογή, ή σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, καθαρότητα $\geq 99\%$), ως δεύτερη επιλογή διαλύτη/φορέα εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία

σ

τ

ο

ι

χ

α

δεν είναι διαλυτή στον διαλύτη/φορέα πλήρους θρεπτικού μέσου. Για τη δοκιμή, η υπό δοκιμή χημική ουσία διαλύεται σε τελική συγκέντρωση 0,4 mg/ml σε πλήρες θρεπτικό μέσο, εφόσον είναι διαλυτή στον συγκεκριμένο διαλύτη/φορέα. Εάν η χημική ουσία είναι διαλυτή μόνο σε DMSO, διαλύεται σε συγκέντρωση 50 mg/ml. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι διαλύτες/φορείς, πέραν των όσων περιγράφονται ανωτέρω, εφόσον η χρήση τους τεκμηριώνεται επαρκώς επιστημονικά. Θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον τελικό διαλύτη/φορέα.

14. Η προετοιμασία των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων γίνεται την ημέρα της δοκιμής. Λόγω του ότι δεν διεξάγεται δοκιμασία προσδιορισμού δόσης, για την πρώτη σειρά δοκιμών θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή 6 τελικές συγκεντρώσεις (1, 10, 20, 50, 100 και 200 µg/ml) στον αντίστοιχο διαλύτη/φορέα, είτε σε πλήρες θρεπτικό μέσο είτε σε DMSO 0,4 % σε θρεπτικό μέσο. Για τις επόμενες σειρές δοκιμών, ξεκινώντας από τα 0,4 mg/ml σε πλήρες θρεπτικό μέσο ή τα 50 mg/ml σε DMSO, παρασκευάζονται διαλύματα των υπό δοκιμή χημικών ουσιών, τουλάχιστον 4 διαλύματα εργασίας (δηλ. τουλάχιστον 4 συγκεντρώσεις), με χρήση του αντίστοιχου διαλύτη/φορέα. Τα διαλύματα εργασίας χρησιμοποιούνται τελικώς για την αγωγή, με προσθήκη ίσου όγκου εναιωρήματος κυττάρων U937 (βλ. παράγραφο 11 ανωτέρω) στον όγκο του διαλύματος εργασίας στο τρυβλίο ώστε να πραγματοποιηθεί νέα αραιώση 2x (12). Οι συγκεντρώσεις (τουλάχιστον 4 συγκεντρώσεις) για κάθε επόμενη σειρά δοκιμών επιλέγονται με βάση τα επιμέρους αποτελέσματα όλων των προηγούμενων σειρών δοκιμών (8). Οι χρησιμοποιήσιμες τελικές συγκεντρώσεις είναι 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 και 200 µg/ml. Η μέγιστη τελική συγκέντρωση είναι 200 µg/ml. Στην περίπτωση που παρατηρηθεί θετική τιμή του CD86 στο 1 µg/ml, τότε, αξιολογείται 0,1 µg/ml προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που δεν επάγει CD86 άνω του θετικού ορίου. Για κάθε σειρά δοκιμών, υπολογίζεται η EC150 (συγκέντρωση στην οποία μια υπό δοκιμή χημική ουσία φθάνει το θετικό όριο CD86 του 150 %, βλ. παράγραφο 19), εφόσον παρατηρηθεί θετική απόκριση του CD86 που σχετίζεται με τη συγκέντρωση. Σε περίπτωση που η υπό δοκιμή χημική ουσία επάγει θετική απόκριση του CD86 που δεν σχετίζεται με τη συγκέντρωση, μπορεί να μην είναι σκόπιμο να υπολογίζεται η EC150, όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο U-SENS™ DB-ALM αριθ. 183 (12). Για κάθε σειρά δοκιμών, υπολογίζεται η CV70 (συγκέντρωση στην οποία μια χημική ουσία φθάνει το όριο κυτταροτοξικότητας του 70%, βλ. παράγραφο 19), όποτε αυτό είναι εφικτό (12). Για τη διερεύνηση της επίδρασης της απόκρισης βάσει συγκέντρωσης λόγω αύξησης του CD86, οποιεσδήποτε από τις κατάλληλες συγκεντρώσεις θα πρέπει να επιλέγονται έτσι ώστε να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένες μεταξύ της EC150 (ή της υψηλότερης αρνητικής μη κυτταροτοξικής συγκέντρωσης του CD86) και της CV70 (ή της υψηλότερης επιτρεπόμενης συγκέντρωσης, δηλαδή 200 µg/ml). Θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή

τουλάχιστον 4 συγκεντρώσεις ανά σειρά δοκιμών, με τουλάχιστον 2 εξ αυτών να είναι κοινές με την προηγούμενη σειρά/-ές δοκιμών, για λόγους σύγκρισης.

15. Ο διαλύτης/φορέας που χρησιμοποιείται στη δοκιμή U-SENS™ είναι πλήρες θρεπτικό μέσο (για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που διαλύονται ή διασπείρονται σταθερώς) (βλ. παράγραφο 4) ή DMSO 0,4 % σε πλήρες θρεπτικό μέσο (για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που διαλύονται ή διασπείρονται σταθερώς σε DMSO).
16. Ο θετικός μάρτυρας που χρησιμοποιείται στη δοκιμή U-SENS™ είναι TNBS (βλ. παράγραφο 11), παρασκευαζόμενο σε πλήρες θρεπτικό μέσο. Το TNBS θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας για τη μέτρηση της έκφρασης του CD86 σε μία τελική συγκέντρωση στο τρυβλίο (50 µg/ml) που δίδει κυτταρική βιωσιμότητα > 70 %. Για την επίτευξη συγκέντρωσης TNBS 50 µg/ml στο τρυβλίο, παρασκευάζεται αποθεματικό διάλυμα TNBS 1 M (δηλ. 293 mg/ml) σε πλήρες θρεπτικό μέσο, το οποίο αραιώνεται περαιτέρω 2930x με πλήρες θρεπτικό μέσο ώστε να προκύψει διάλυμα εργασίας 100 µg/ml. Ως αρνητικός μάρτυρας θα πρέπει να χρησιμοποιείται γαλακτικό οξύ (LA, CAS 50-21-5) σε 200 µg/ml διαλυμένο σε πλήρες θρεπτικό μέσο (από αποθεματικό διάλυμα 0,4 mg/ml). Σε κάθε τρυβλίο κάθε σειράς δοκιμών, παρασκευάζονται τρία πανομοιότυπα δείγματα μάρτυρα πλήρους θρεπτικού μέσου χωρίς αγωγή, μάρτυρα με διαλύτη/φορέα και αρνητικών και θετικών μαρτύρων (12). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι κατάλληλοι θετικοί μάρτυρες, εάν υπάρχουν διαθέσιμα ιστορικά δεδομένα από τα οποία μπορούν να προκύψουν συγκρίσιμα κριτήρια αποδοχής σειρών δοκιμών. Τα κριτήρια αποδοχής σειρών δοκιμών είναι τα ίδια με εκείνα που περιγράφονται για την υπό δοκιμή χημική ουσία (βλ. παράγραφο 12).

Εφαρμογή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

17. Ο μάρτυρας με διαλύτη/φορέα ή τα διαλύματα εργασίας που περιγράφονται στις παραγράφους 14-16 αναμιγνύονται 1:1 (κ.ό.) με τα ελαιώδη κυττάρων που παρασκευάστηκαν στο τρυβλίο επίπεδης βάσης 96 κοιλοτήτων (βλ. παράγραφο 12). Στη συνέχεια, τα υπό αγωγή τρυβλία επωάζονται επί 45±3 ώρες στους 37°C με 5 % CO₂. Πριν από την επώαση, τα τρυβλία καλύπτονται με ημιπερατή μεμβράνη ώστε να αποφεύγεται η εξάτμιση των πτητικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών και η διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των κυττάρων που υποβάλλονται σε αγωγή με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες (12).

Χρώση των κυττάρων

18. Μετά από 45±3 ώρες έκθεσης, τα κύτταρα μεταφέρονται στο τρυβλίο μικροτιλοδότησης σχήματος V συλλέγονται μέσω φυγοκέντρωσης. Η παρεμπόδιση λόγω διαλυτότητας ορίζεται παρουσία κρυστάλλων ή σταγόνων ορατών στο μικροσκόπιο μετά την πάροδο 45 ± 3 ωρών από την αγωγή (πριν από τη χρώση των κυττάρων). Τα υπερκείμενα υγρά απορρίπτονται και τα εναπομείναντα κύτταρα εκπλένονται μία φορά με 100 µl

παγόψυχρου αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS) που περιέχει 5 % ορού εμβρύων μύσχων (ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης). Μετά τη φυγοκέντρωση, τα κύτταρα εναιωρούνται εκ νέου με 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος χρώσης και υποβάλλονται σε χρώση με 5 μl (π.χ. 0,25 μg) σημασμένων με FITC αντισωμάτων αντι-CD86 ή αντισωμάτων IgG1 (ισοτύπου) ποντικού σε θερμοκρασία 4°C επί 30 λεπτά, προστατευμένα από το φως. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τα αντισώματα που περιγράφονται στο πρωτόκολλο U-SENS™ DB-ALM αριθ. 183 (12) (για τον CD86: BD-PharMingen #555657, κλώνος: Fun-1 ή Caltag/Invitrogen # MHCD8601, κλώνος: BU63, και για το IgG1: BD-PharMingen #555748, ή Caltag/Invitrogen # GM4992). Με βάση την εμπειρία των φορέων ανάπτυξης της δοκιμής, η ένταση του φθορισμού των αντισωμάτων είναι συνήθως παρεμφερής μεταξύ των διαφόρων παρτίδων. Για τη δοκιμασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί άλλος κλώνος ή προμηθευτής των αντισωμάτων που υποβλήθηκαν επιτυχώς στον έλεγχο δραστηριότητας (βλ. παράγραφο 11). Ωστόσο, οι χρήστες μπορούν να εξετάσουν το ενδεχόμενο να τιτλοδοτήσουν τα αντισώματα υπό τις συνθήκες του δικού τους εργαστηρίου προκειμένου να καθορίσουν τη βέλτιστη συγκέντρωση προς χρήση. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και άλλο σύστημα ανίχνευσης, π.χ. σημασμένα με φθοριοχρώματα αντισώματα αντι-CD86, εφόσον μπορεί να αποδειχθεί ότι αποδίδει ανάλογα αποτελέσματα με αυτά των συζευγμένων με FITC αντισωμάτων, για παράδειγμα, μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 2.2. Μετά από έκπλυση δύο φορές με 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος και μία φορά με 100 μl παγόψυχρου PBS, τα κύτταρα εναιωρούνται εκ νέου σε παγόψυχρο PBS (π.χ. 125 μl για δείγματα που αναλύονται με μη αυτόματο τρόπο, σωληνάριο προς σωληνάριο, ή 50 μl όταν χρησιμοποιείται τρυβλίο αυτόματης δειγματοληψίας) και προστίθεται διάλυμα PI (τελική συγκέντρωση 3 μg/ml). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι δείκτες κυτταροτοξικότητας, όπως 7-αμινοακτινομυκίνη D (7-AAD) ή Trypan Blue, εάν μπορεί να αποδειχθεί ότι οι εναλλακτικές χρώσεις αποδίδουν αποτελέσματα παρεμφερή με το PI, για παράδειγμα μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 2.2.

Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής

19. Το επίπεδο έκφρασης του CD86 και η κυτταρική βιωσιμότητα αναλύονται με χρήση κυτταρομετρίας ροής. Τα κύτταρα απεικονίζονται σε στικτόγραμμα μεγέθους (FSC) και κοκκίωσης (SSC) ρυθμισμένου σε λογαριθμική κλίμακα προκειμένου να προσδιοριστεί με σαφήνεια ο πληθυσμός σε ένα πρώτο παράθυρο επιλογής R1 και να εξαλειφθούν τα κατάλοιπα κυττάρων. Για κάθε κοιλότητα καταγράφεται συνολικός στόχος 10 000 κυττάρων στο παράθυρο επιλογής R1. Τα κύτταρα από το ίδιο παράθυρο επιλογής R1 απεικονίζονται σε στικτόγραμμα FL3 ή FL4 / SSC. Τα βιώσιμα κύτταρα ανιχνεύονται με την τοποθέτηση δεύτερου παραθύρου επιλογής R2 για την επιλογή του πληθυσμού των αρνητικών στο ιωδιούχο προπίδιο κυττάρων (διάυλος FL3 ή FL4). Η κυτταρική βιωσιμότητα μπορεί να υπολογίζεται με χρήση της ακόλουθης εξίσωσης από το

πρόγραμμα ανάλυσης του κυτταρόμετρου. Όταν η κυτταρική βιωσιμότητα είναι χαμηλή, μπορούν να καταγράφονται έως 20 000 κύτταρα, περιλαμβανομένων των νεκρών κυττάρων. Εναλλακτικά, μπορούν να καταγράφονται δεδομένα επί ένα λεπτό μετά την έναρξη της ανάλυσης.

$$\text{βιωσιμότητα} = \frac{\text{αριθμός ζωντανών κυττάρων}}{\text{συνολικός αριθμός μετρηθέντων κυττάρων}} \times 100$$

Στη συνέχεια, μετράται το ποσοστό των θετικών στο FL1 κυττάρων μεταξύ των εν λόγω βιώσιμων κυττάρων που επιλέγονται στο παράθυρο επιλογής R2 (εντός του R1). Η έκφραση κυτταρικής επιφάνειας του CD86 αναλύεται σε στικτόγραμμα FL1 / SSC με επιλογή των βιώσιμων κυττάρων (R2).

Για τις κοιλότητες πλήρους θρεπτικού μέσου/IgG1, ο δείκτης ανάλυσης ορίζεται κοντά στον βασικό πληθυσμό ούτως ώστε οι μάρτυρες με πλήρες θρεπτικό μέσο να έχουν IgG1 εντός της ζώνης στόχου 0,6 έως 0,9 %.

Η παρεμπόδιση λόγω χρώματος ορίζεται ως μετατόπιση του στικτογράμματος της σημασμένης με FITC IgG1 (S.I. γεωμετρικού μέσου IgG1 FL1 ≥ 150 %).

Ο δείκτης διέγερσης (S.I.) του CD86 για τα κύτταρα μάρτυρα (χωρίς αγωγή ή σε DMSO 0,4 %) και τα υποβληθέντα σε αγωγή κύτταρα υπολογίζεται σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$S.I. = \frac{\% \text{ κυττάρων } CD86^{+} \text{ υπό αγωγή} - \% \text{ κυττάρων } IgG1^{+} \text{ υπό αγωγή}}{\% \text{ κυττάρων } CD86^{+} \text{ μάρτυρα} - \% \text{ κυττάρων } IgG1^{+} \text{ μάρτυρα}} \times 100$$

% των κυττάρων IgG1⁺ μάρτυρα χωρίς αγωγή: αναφέρεται ως ποσοστό των θετικών στο FL1 κυττάρων IgG1 που ορίζεται με τον δείκτη ανάλυσης (αποδεκτό εύρος $\geq 0,6$ % και $< 1,5$ %, βλ. παράγραφο 22) μεταξύ των βιώσιμων κυττάρων χωρίς αγωγή.

% των κυττάρων μάρτυρα / κυττάρων χωρίς αγωγή IgG1⁺/CD86⁺: αναφέρεται ως ποσοστό των θετικών στο FL1 κυττάρων IgG1/CD86 που μετρώνται χωρίς μετακίνηση του δείκτη ανάλυσης μεταξύ των βιώσιμων κυττάρων μάρτυρα / κυττάρων χωρίς αγωγή.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αξιολόγηση των δεδομένων

20. Στη δοκιμή U-SENSTM υπολογίζονται οι ακόλουθες παράμετροι: Η τιμή CV70, δηλαδή η συγκέντρωση που δίνει 70 % επιβίωση των κυττάρων U937 (30 % κυτταροτοξικότητα), και η τιμή EC150, δηλαδή η συγκέντρωση στην οποία οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες επάγουν δείκτη διέγερσης (S.I.) CD86 150 %.

Η CV70 υπολογίζεται με λογαριθμική-γραμμική παρεκβολή με χρήση της ακόλουθης εξίσωσης:

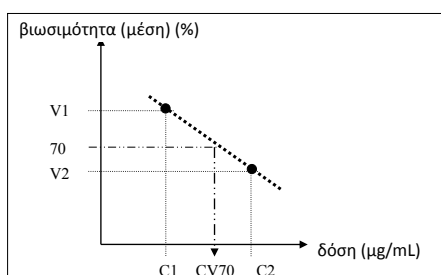
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

Όπου:

V1 είναι η ελάχιστη τιμή κυτταρικής βιωσιμότητας άνω του 70 %

V2 είναι η μέγιστη τιμή κυτταρικής βιωσιμότητας κάτω του 70 %

C1 και C2 είναι οι συγκεντρώσεις που εμφανίζουν την τιμή κυτταρικής βιωσιμότητας V1 και V2 αντίστοιχα



Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες προσεγγίσεις για τον υπολογισμό της τιμής CV70, εφόσον αποδεικνύεται ότι δεν έχουν επιπτώσεις στα αποτελέσματα (π.χ. μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας).

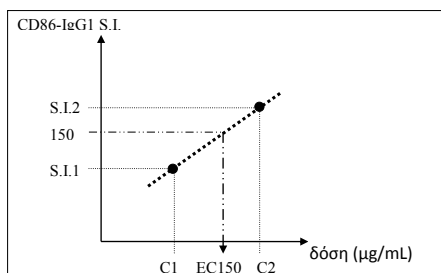
Η EC150 υπολογίζεται με λογαριθμική-γραμμική παρεκβολή με χρήση της ακόλουθης εξίσωσης:

$$EC150 = C1 + [(150 - S.I.1) / (S.I.2 - S.I.1) * (C2 - C1)]$$

Όπου:

C1 είναι η υψηλότερη συγκέντρωση σε μg/ml με S.I. του CD86 < 150 % (S.I. 1)

C2 είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση σε μg/ml με S.I. του CD86 ≥ 150 % (S.I. 2)



Οι τιμές EC150 και CV70 υπολογίζονται

- για κάθε σειρά δοκιμών: οι επιμέρους τιμές EC150 και CV70 χρησιμοποιούνται ως εργαλεία για τη διερεύνηση της επίπτωσης της απόκρισης βάσει συγκέντρωσης από την αύξηση του CD86 (βλ. παράγραφο 14),
- με βάση τις μέσες βιωσιμότητες, προσδιορίζεται η συνολική CV70 (12),
- με βάση τον μέσο S.I. των τιμών CD86, προσδιορίζεται η συνολική EC150 για την υπό δοκιμή χημική ουσία που έχει προβλεφθεί ως ΘΕΤΙΚΗ με τη δοκιμή U-SENS™ (βλ. παράγραφο 21) (12).

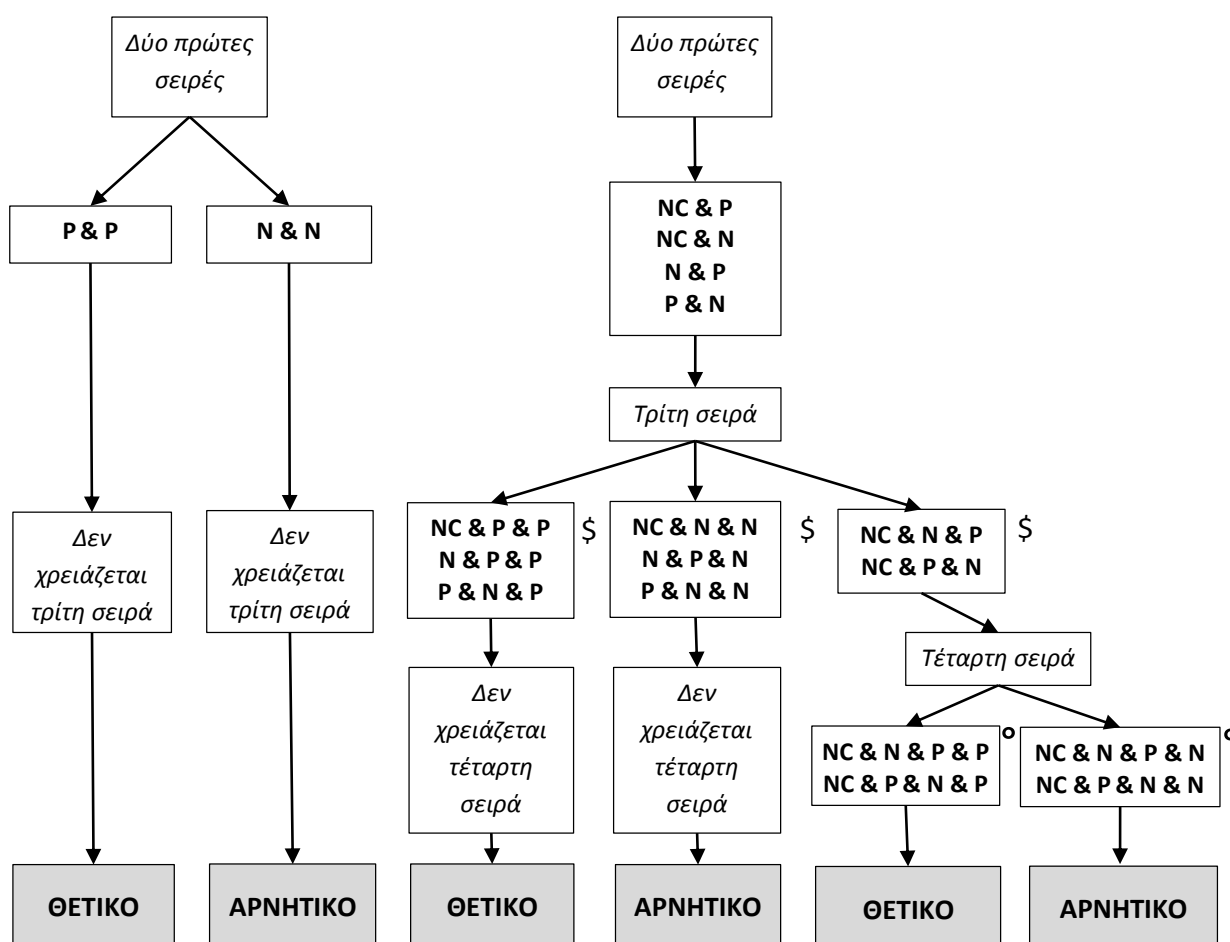
Μοντέλο πρόβλεψης

21. Για τη μέτρηση της έκφρασης του CD86, κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία ελέγχεται σε τουλάχιστον τέσσερις συγκεντρώσεις και σε τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες σειρές δοκιμών (που διεξάγονται σε διαφορετική ημέρα) για την πραγματοποίηση μιας μεμονωμένης πρόβλεψης (APNΗΤΙΚΗ ή ΘΕΤΙΚΗ).

- Το επιμέρους συμπέρασμα μιας σειράς δοκιμών U-SENS™ θεωρείται αρνητικό (στο εξής αναφέρεται ως Α), εάν ο S.I. του CD86 είναι μικρότερος από 150 % σε όλες τις μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις (κυτταρική βιωσιμότητα ≥ 70 %) και εάν δεν παρατηρείται καμία παρεμπόδιση (κυτταροτοξικότητα, διαλυτότητα: βλ. παράγραφο 18 ή χρώμα: βλ. παράγραφο 19, ανεξάρτητα από τις μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις στις οποίες ανιχνεύεται η παρεμπόδιση). Σε όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις: ο S.I. του CD86 είναι ίσος ή μεγαλύτερος από 150 % και/ή παρατηρούνται παρεμποδίσεις, το επιμέρους συμπέρασμα μιας σειράς δοκιμών U-SENS™ θεωρείται θετικό (στο εξής αναφέρεται ως Θ).
- Μια πρόβλεψη U-SENS™ θεωρείται APNΗΤΙΚΗ εάν είναι αρνητικές (Α) τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες σειρές δοκιμών (σχήμα 1). Εάν οι δύο πρώτες σειρές δοκιμών είναι και οι δύο αρνητικές (Α), η πρόβλεψη U-SENS™ θεωρείται APNΗΤΙΚΗ και δεν χρειάζεται τρίτη σειρά δοκιμών.
- Μια πρόβλεψη U-SENS™ θεωρείται ΘΕΤΙΚΗ εάν είναι θετικές (Θ) τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες σειρές δοκιμών (σχήμα 1). Εάν οι δύο πρώτες σειρές δοκιμών είναι και οι δύο θετικές (Θ), η πρόβλεψη U-SENS™ θεωρείται ΘΕΤΙΚΗ και δεν χρειάζεται τρίτη σειρά δοκιμών.
- Λόγω του ότι δεν διεξάγεται δοκιμασία προσδιορισμού δόσης, υπάρχει μία εξαίρεση σε περίπτωση που, στην πρώτη σειρά δοκιμών, ο S.I. του CD86 είναι ίσος ή μεγαλύτερος από 150 % μόνο στην υψηλότερη μη κυτταροτοξική συγκέντρωση. Τότε, η σειρά δοκιμών θεωρείται ΜΗ ΚΑΤΑΛΗΚΤΙΚΗ (MK), και θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή πρόσθετες συγκεντρώσεις (μεταξύ της υψηλότερης μη κυτταροτοξικής συγκέντρωσης και

της χαμηλότερης κυτταροτοξικής συγκέντρωσης - βλ. παράγραφο 20). Σε περίπτωση που μια σειρά δοκιμών χαρακτηριστεί MK, θα πρέπει να διεξάγονται τουλάχιστον 2 πρόσθετες σειρές δοκιμών, και μία τέταρτη σε περίπτωση που οι σειρές 2 και 3 δεν συμφωνούν (Α και/ή Θ, ανεξαρτήτως) (σχήμα 1). Οι επακόλουθες σειρές δοκιμών θα θεωρούνται θετικές ακόμη και εάν μία μόνο μη κυτταροτοξική συγκέντρωση δίδει CD86 ίσο ή άνω του 150 %, δεδομένου ότι η τιμή της συγκέντρωσης έχει προσαρμοστεί για τη συγκεκριμένη υπό δοκιμή χημική ουσία. Η τελική συγκέντρωση θα βασίζεται στο αποτέλεσμα των τριών ή τεσσάρων επιμέρους σειρών δοκιμών κατά πλειοψηφία (δηλ. 2 από 3 ή 2 από 4) (σχήμα 1).

Σχήμα 1: Το μοντέλο πρόβλεψης που χρησιμοποιείται στη δοκιμή U-SENS™. Οι προβλέψεις βάσει δοκιμής U-SENS™ θα πρέπει να εξετάζονται στο πλαίσιο IATA και σύμφωνα με τις πληροφορίες στην παράγραφο 4 και στις παραγράφους 7, 8 και 9 της γενικής εισαγωγής.



N: δοκιμασία στην οποία δεν παρατηρείται θετικό CD86 ή παρεμπόδιση,

P: δοκιμασία στην οποία παρατηρείται θετικό CD86 και/ή παρεμπόδιση,

NC: μη καταληκτική. Η πρώτη μη καταληκτική σειρά δοκιμών όταν το CD86 είναι θετικό μόνο στην υψηλότερη μη κυτταροτοξική συγκέντρωση,

#: εάν χαρακτηριστεί «μη καταληκτική» μόνο η πρώτη σειρά δοκιμών τότε αυτομάτως επιβάλλεται η διεξαγωγή τρίτης σειράς δοκιμών προκειμένου να επιτευχθεί πλειοψηφική αναλογία θετικών (P) ή αρνητικών (N) συμπερασμάτων σε τουλάχιστον 2 από 3 ανεξάρτητες σειρές δοκιμών.

S: εντός των πλαισίων παρουσιάζονται οι σχετικοί συνδυασμοί αποτελεσμάτων από τις τρεις σειρές δοκιμών με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τις δύο πρώτες σειρές δοκιμών που παρουσιάζονται στο πλαίσιο ανωτέρω.

°: εντός των πλαισίων παρουσιάζονται οι σχετικοί συνδυασμοί αποτελεσμάτων από τις τέσσερις σειρές δοκιμών με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τις τρεις πρώτες σειρές δοκιμών που παρουσιάζονται στο πλαίσιο ανωτέρω.

Κριτήρια αποδοχής

22. Όταν χρησιμοποιείται η δοκιμή U-SENS™, θα πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια αποδοχής (12).

- Στο τέλος της περιόδου έκθεσης 45 ± 3 ωρών, η μέση βιωσιμότητα των εις τριπλούν επιστρωμένων κυττάρων U937 χωρίς αγωγή θα πρέπει να είναι $> 90 \%$, χωρίς να παρατηρείται ολίσθηση της έκφρασης CD86. Η βασική έκφραση του CD86 στα κύτταρα U937 χωρίς αγωγή θα πρέπει να είναι $\geq 2 \%$ και $\leq 25 \%$.
- Όταν ως διαλύτης χρησιμοποιείται DMSO, η εγκυρότητα του μάρτυρα με φορέα DMSO εκτιμάται μέσω υπολογισμού τιμής S.I. για το DMSO σε σύγκριση με τα κύτταρα χωρίς αγωγή, και η μέση βιωσιμότητα των επιστρωμένων εις τριπλούν κυττάρων πρέπει να είναι $> 90 \%$. Ο μάρτυρας με φορέα DMSO είναι έγκυρος εάν η μέση τιμή S.I. του CD86 εις τριπλούν είναι μικρότερη από το 250% της μέσης τιμής S.I. του CD86 εις τριπλούν των κυττάρων U937 χωρίς αγωγή.
- Οι σειρές δοκιμών θεωρούνται έγκυρες εάν τουλάχιστον δύο από τρεις τιμές IgG1 κυττάρων U937 χωρίς αγωγή είναι $\geq 0,6 \%$ και $< 1,5 \%$.
- Ο παράλληλος αρνητικός μάρτυρας (γαλακτικό οξύ) θεωρείται έγκυρος εάν τουλάχιστον δύο από τα τρία πανομοιότυπα δείγματα είναι αρνητικά (S.I. CD86 $< 150 \%$) και χωρίς κυτταροτοξικότητα (κυτταρική βιωσιμότητα $\geq 70 \%$).
- Ο θετικός μάρτυρας (TNBS) θεωρείται έγκυρος εάν τουλάχιστον δύο από τα τρία πανομοιότυπα δείγματα είναι θετικά (S.I. CD86 $< 150 \%$) και χωρίς κυτταροτοξικότητα (κυτταρική βιωσιμότητα $\geq 70 \%$).

Έκθεση δοκιμής

23. Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία.

Υπό δοκιμή χημική ουσία

Μονοσυστατική ουσία

- ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,
- φυσική εμφάνιση, διαλυτότητα πλήρους θρεπτικού μέσου, διαλυτότητα σε DMSO, μοριακό βάρος και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, εφόσον είναι διαθέσιμα,
- καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,
- κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),
- ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,
- συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,
- αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγμα:

- χαρακτηρισμός, στο μέτρο του δυνατού, π.χ. χημική ταυτότητα (βλ. ανωτέρω), καθαρότητα, ποσότητα και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες (βλ. ανωτέρω) των συστατικών, εφόσον είναι διαθέσιμα,
- φυσική εμφάνιση, διαλυτότητα πλήρους θρεπτικού μέσου, διαλυτότητα σε DMSO και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, εφόσον είναι διαθέσιμα,
- μοριακό βάρος ή φαινόμενο μοριακό βάρος στην περίπτωση των μειγμάτων/πολυμερών γνωστής σύνθεσης ή άλλες πληροφορίες που έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης,
- κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),
- ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,
- συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,
- αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Μάρτυρες

Θετικός μάρτυρας

- ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,

- φυσική εμφάνιση, διαλυτότητα σε DMSO, μοριακό βάρος και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, στο μέτρο του δυνατού και ανάλογα με την περίπτωση,
- καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,
- κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),
- ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,
- συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,
- παραπομπή σε ιστορικά αποτελέσματα θετικών μαρτύρων που καταδεικνύουν την εφαρμογή κατάλληλων κριτηρίων αποδοχής των μετρήσεων, εάν ισχύει.

Αρνητικός μάρτυρας και μάρτυρας με διαλύτη/φορέα

- ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,
- καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,
- φυσική εμφάνιση, μοριακό βάρος, καθώς και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, σε περίπτωση χρήσης άλλου διαλύτη/φορέα εκτός εκείνων που αναφέρονται στην κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών και εφόσον είναι διαθέσιμα,
- συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,
- αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Συνθήκες δοκιμής

- όνομα και διεύθυνση του χορηγού, της εγκατάστασης δοκιμών και του διευθυντή της μελέτης,
- περιγραφή της χρησιμοποιούμενης δοκιμής,
- κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε, συνθήκες φύλαξης και προέλευσή της (π.χ. εγκατάσταση προέλευσης),
- χρησιμοποιηθείσα μέθοδος κυτταρομετρίας ροής (π.χ. μοντέλο), περιλαμβανομένων των χρησιμοποιηθέντων οργάνων, αντισωμάτων και δεικτών κυτταροτοξικότητας,
- η διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για να αποδειχθεί η τεχνική ικανότητα του εργαστηρίου να διεξάγει τη δοκιμή μέσω δοκιμών των ουσιών ελέγχου ικανότητας, και η διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για να αποδειχθεί η διαχρονική αναπαραγωγικότητα της διεξαγωγής της δοκιμής, π.χ. ιστορικά δεδομένα για μάρτυρες και/ή ιστορικά δεδομένα ελέγχων δραστηριότητας.

Κριτήρια αποδοχής της δοκιμής

- κυτταρική βιωσιμότητα και τιμές S.I. CD86 που ελήφθησαν με τον μάρτυρα με διαλύτη/φορέα σε σύγκριση με τα αποδεκτά πεδία τιμών,
- κυτταρική βιωσιμότητα και τιμές S.I. που ελήφθησαν με τον θετικό μάρτυρα σε σύγκριση με τα αποδεκτά πεδία τιμών,
- κυτταρική βιωσιμότητα όλων των ελεγχθεισών συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Διαδικασία δοκιμής

- αριθμός σειρών δοκιμών που χρησιμοποιήθηκαν,
- συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, χρόνος εφαρμογής και έκθεσης που χρησιμοποιήθηκε (εάν διαφέρει από τον συνιστώμενο),
- διάρκεια της έκθεσης,
- περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αξιολόγησης και λήψης αποφάσεων,
- περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμής.

Αποτελέσματα

- δεδομένα υπό μορφή πίνακα, περιλαμβανομένης της CV70 (κατά περίπτωση), του S.I., των τιμών κυτταρικής βιωσιμότητας, των τιμών EC150 (κατά περίπτωση) που υπολογίστηκαν για την υπό δοκιμή χημική ουσία και για τον θετικό μάρτυρα σε κάθε σειρά δοκιμών, και ένδειξη της κατάταξης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σύμφωνα με το μοντέλο πρόβλεψης,
- περιγραφή κάθε άλλης σχετικής παρατήρησης, κατά περίπτωση.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

- εξέταση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με τη δοκιμή U-SENS™,
- εξέταση των αποτελεσμάτων δοκιμής στο πλαίσιο της IATA, εάν υπάρχουν σχετικές πληροφορίες.

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (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) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: 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 EL· doi 10.2787/815737. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [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 EL· doi 10.2760/588955. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-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. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: [<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). 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. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: 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), 33pp. Διαθέσιμο στη διεύθυνση: [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. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: <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. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: 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. Μέρος 1: Series on Testing and Assessment No. Organisation for

Economic Cooperation and Development, Paris. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: <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. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Προσάρτημα 2.1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της δοκιμής και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της δοκιμής και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας δοκιμής (14).

AOP (Adverse Outcome Pathway): πορεία δυσμενούς έκβασης: αλληλουχία συμβάντων, από τη χημική δομή της στοχευόμενης χημικής ουσίας ή ομάδας ομοειδών χημικών ουσιών και το μοριακό εναρκτήριο συμβάν μέχρι την εξεταζόμενη έκβαση *in vivo* (15).

Απόκριση συγκέντρωσης CD86: η απόκριση εξαρτάται από τη συγκέντρωση (απόκριση συγκέντρωσης) όταν μια θετική συγκέντρωση (S.I. $CD86 \geq 150$) ακολουθείται από συγκέντρωση με αυξανόμενο S.I. CD86.

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

CV70: η εκτιμώμενη συγκέντρωση που παρουσιάζει κυτταρική βιωσιμότητα 70%.

Ολίσθηση: ολίσθηση υφίσταται όταν i) η διορθωμένη τιμή $\%CD86^+$ του πανομοιότυπου δείγματος 3 του μάρτυρα χωρίς αγωγή είναι μικρότερη από το 50 % του μέσου όρου της διορθωμένης τιμής $\%CD86^+$ των πανομοιότυπων δειγμάτων 1 και 2 του μάρτυρα χωρίς αγωγή, και όταν ii) η διορθωμένη τιμή $\%CD86^+$ του πανομοιότυπου δείγματος 3 του αρνητικού μάρτυρα είναι μικρότερη από το 50 % του μέσου όρου της διορθωμένης τιμής $\%CD86^+$ των πανομοιότυπων δειγμάτων 1 και 2 του αρνητικού μάρτυρα.

EC150: οι εκτιμώμενες συγκεντρώσεις που εμφανίζουν S.I. 150 % της έκφρασης του CD86.

Κυτταρομετρία ροής: κυτταρομετρική τεχνική κατά την οποία κύτταρα εναιωρημένα εντός υγρού διασχίζουν ένα-ένα την εστία μιας φωτεινής δέσμης διέγερσης, η οποία σκεδάζεται με τρόπους χαρακτηριστικούς των κυττάρων και των συστατικών τους· τα κύτταρα σημαίνονται συχνά με φθορίζοντες δείκτες οι οποίοι πρώτα απορροφούν και κατόπιν επανεκπέμπουν το φως σε διαφορετική συχνότητα.

Επικινδυνότητα: εγγενής ιδιότητα ενός παράγοντα ή μιας κατάστασης που μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις όταν ένας οργανισμός, ένα σύστημα ή ένας (υπο)πληθυσμός εκτίθεται στον παράγοντα.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση: δομημένη προσέγγιση που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας (δυναμικό), τον χαρακτηρισμό της επικινδυνότητας (ισχύς) και/ή την εκτίμηση της ασφάλειας (δυναμικό/ισχύς και έκθεση) μιας χημικής ουσίας

ή ομάδας χημικών ουσιών, στην οποία ενσωματώνονται και σταθμίζονται στρατηγικά όλα τα σχετικά δεδομένα, με σκοπό την τροφοδότηση κανονιστικών αποφάσεων σχετικά με τη δυνητική επικινδυνότητα και/ή τον κίνδυνο και/ή την ανάγκη για περαιτέρω στοχευμένες και, ως εκ τούτου, ελάχιστες δοκιμές.

Μείγμα: ένα μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες.

Μονοσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας ένα κύριο συστατικό περιέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 80 % κ.β.

Πολυσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας περισσότερα από ένα κύρια συστατικά περιέχονται σε συγκέντρωση ≥ 10 % κ.β. και < 80 % κ.β. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα μεταποιητικών διεργασιών. Η διαφορά μεταξύ μείγματος και πολυσυστατικής ουσίας είναι ότι το μείγμα λαμβάνεται με ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, χωρίς χημική αντίδραση. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα χημικών αντιδράσεων.

Θετικός μάρτυρας: πανομοιότυπο δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με ουσία που είναι γνωστό ότι προκαλεί θετική απόκριση. Για να διασφαλίζεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της θετικής απόκρισης δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

Αβιοτικά προαπτένια: χημικές ουσίες που καθίστανται ευαισθητοποιητικές μέσω αβιοτικού μετασχηματισμού, π.χ. μέσω οξείδωσης.

Μεταβολικά προαπτένια: χημικές ουσίες που χρειάζονται ενζυμική ενεργοποίηση για να εκδηλώσουν το δυναμικό δερματικής ευαισθητοποίησής τους.

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της δοκιμής με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή έχει σημασία και είναι χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμή μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της δοκιμής (14).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια δοκιμή μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, καθώς και της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας (14).

Σειρά δοκιμών: μια σειρά περιλαμβάνει μία ή περισσότερες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που υποβάλλονται σε δοκιμή ταυτόχρονα με μάρτυρα με διαλύτη/φορέα και με θετικό μάρτυρα.

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των δοκιμών με τις οποίες

λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, και είναι σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των δοκιμών (14).

S.I.: δείκτης διέγερσης. Οι σχετικές τιμές του γεωμετρικού μέσου όρου έντασης φθορισμού σε κύτταρα που υποβάλλονται σε αγωγή με υπό δοκιμή χημική ουσία σε σύγκριση με κύτταρα που υποβάλλονται σε αγωγή με διαλύτη/φορέα.

Μάρτυρας με διαλύτη/φορέα: δείγμα που δεν υποβάλλεται σε αγωγή και περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής, εκτός της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, αλλά περιλαμβανομένου του διαλύτη/φορέα που χρησιμοποιείται. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της βασικής απόκρισης των δειγμάτων που υποβάλλονται σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία διαλυμένη ή σταθερώς διεσπαρμένη στον ίδιο διαλύτη/φορέα. Όταν το εν λόγω δείγμα υποβάλλεται σε δοκιμή με παράλληλο μάρτυρα θρεπτικού μέσου, καταδεικνύει επίσης αν ο διαλύτης/φορέας αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας της δοκιμής με την οποία λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας της δοκιμής (14).

Ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης: αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων που περιέχει 5 % ορού εμβρύων μόσχων.

Ουσία: ένα χημικό στοιχείο και οι ενώσεις του σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητά του, καθώς και τυχόν προσμείξεις που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με χρήση της παρούσας δοκιμής.

Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) (GHS του ΟΗΕ): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικής επικινδυνότητας και επικινδυνότητας για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα στοιχεία γνωστοποίησης, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, με τα οποία γνωστοποιούνται πληροφορίες σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (16).

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

Έγκυρη δοκιμή: δοκιμή που θεωρείται επαρκούς καταλληλότητας και αξιοπιστίας για συγκεκριμένο σκοπό και βασίζεται σε επιστημονικά τεκμηριωμένες αρχές. Μια δοκιμή δεν είναι ποτέ έγκυρη με την απόλυτη σημασία του όρου, αλλά μόνο σε σχέση με καθορισμένο σκοπό (14).

Προσάρτημα 2.2

ΟΥΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

Πριν εντάξουν στην καθημερινή πρακτική τη δοκιμή που περιγράφεται στο παρόν προσάρτημα της μεθόδου δοκιμών B.71, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα επιτυγχάνοντας σωστά την αναμενόμενη πρόβλεψη βάσει της δοκιμής U-SENS™ για τις 10 συνιστώμενες στον πίνακα 1 ουσίες, καθώς και τιμές CV70 και EC150 εντός του αντίστοιχου εύρους τιμών αναφοράς για 8 τουλάχιστον από τις 10 ουσίες ελέγχου ικανότητας. Αυτές οι ουσίες ελέγχου ικανότητας επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικές του φάσματος αποκρίσεων από τις πηγές κινδύνου δερματικής ευαισθητοποίησης. Άλλα κριτήρια επιλογής ήταν ότι οι ουσίες θα πρέπει να είναι διαθέσιμες στο εμπόριο και ότι θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα *in vivo* δεδομένα αναφοράς υψηλής ποιότητας καθώς και *in vitro* δεδομένα υψηλής ποιότητας που προκύπτουν με τη δοκιμή U-SENS™. Επίσης, για τη δοκιμή U-SENS™ υπάρχουν διαθέσιμα δημοσιευμένα δεδομένα αναφοράς (1) (8).

Πίνακας 1: Συνιστώμενες ουσίες για την απόδειξη τεχνικής ικανότητας όσον αφορά τη δοκιμή U-SENS™

Ουσίες ελέγχου ικανότητας	Αριθμός CAS	Φυσική κατάσταση	Πρόβλεψη <i>in vivo</i> ¹	U-SENS™ Διαλύτης/φορέας	U-SENS™ Πεδίο τιμών αναφοράς CV70 σε µg/ml ²	Πεδίο τιμών αναφοράς U-SENS™ σε µg/ml ²
4-Φαινυλενοδιαμίνη	106-50-3	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (ισχυρό)	Πλήρες θρεπτικό μέσο ³	<30	Θετικό (≤10)
Πικρυλοσουλφονικό οξύ	2508-19-2	Υγρό	Ευαισθητοποιητικό (ισχυρό)	Πλήρες θρεπτικό μέσο	>50	Θετικό (≤50)
Μηλεϊνικό διαιθύλιο	141-05-9	Υγρό	Ευαισθητοποιητικό (μετρίως ισχυρό)	DMSO	10-100	Θετικό (≤20)
Ρεσορκινόλη	108-46-3	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (μετρίως ισχυρό)	Πλήρες θρεπτικό μέσο	>100	Θετικό (≤50)
Κιναμωμική αλκοόλη	104-54-1	Στερεό	Ευαισθητοποιητικό (ασθενές)	DMSO	>100	Θετικό (10-100)
4-Αλλυλανισόλη	140-67-0	Υγρό	Ευαισθητοποιητικό (ασθενές)	DMSO	>100	Θετικό (<200)
Σακχαρίνη	81-07-2	Στερεό	Μη ευαισθητοποιητικό	DMSO	>200	Αρνητικό (>200)
Γλυκερίνη	56-81-5	Υγρό	Μη ευαισθητοποιητικό	Πλήρες θρεπτικό μέσο	>200	Αρνητικό (>200)

Γαλακτικό οξύ	50-21-5	Υγρό	Μη ευαισθητοποιητικό	Πλήρες θρεπτικό μέσο	>200	Αρνητικό (>200)
Σαλικυλικό οξύ	69-72-7	Στερεό	Μη ευαισθητοποιητικό	DMSO	>200	Αρνητικό (>200)

Συνομογραφίες: Αριθ. CAS = Αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstract Service

- ¹ Η πρόβλεψη για την επικινδυνότητα *in vivo* (και την ισχύ) βασίζεται σε δεδομένα από LLNA (1) (8). Η *in vivo* ισχύς προκύπτει με χρήση των κριτηρίων που προτείνει το ECETOC (17).
- ² Βάσει των ιστορικών τιμών που παρατηρήθηκαν (1) (8).
- ³ Πλήρες θρεπτικό μέσο: θρεπτικό μέσο RPMI-1640, συμπληρωμένο με 10 % ορού εμβρύων μόσχων, 2 mM L-γλουταμίνης, 100 μονάδες/ml πενικιλίνης και 100 µg/ml στρεπτομυκίνης (8).

Προσάρτημα 3

IN VITRO ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ: ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ IL-8 LUC

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

1. Σε αντίθεση με τις δοκιμασίες που αναλύουν την έκφραση δεικτών κυτταρικής επιφάνειας, η δοκιμασία IL-8-Luc προσδιορίζει ποσοτικά τις αλλαγές στην έκφραση της IL-8, μιας κυτταροκίνης που συνδέεται με την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων (DC). Στην κυτταρική σειρά έκφρασης γονιδίου αναφοράς IL-8 που προέκυψε από την THP-1 (THP-G8, που δημιουργήθηκε από την ανθρώπινη κυτταρική σειρά οξείας μονοκυτταρικής λευχαιμίας THP-1), η έκφραση της IL-8 μετράται μετά από έκθεση σε ευαισθητοποιητικές ουσίες (1). Στη συνέχεια, η έκφραση της λουσιφεράσης χρησιμοποιείται για την υποστήριξη της διάκρισης μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος.
2. Η δοκιμασία IL-8 Luc έχει αξιολογηθεί στο πλαίσιο μελέτης επικύρωσης (2) που διεξήγαγε το Ιαπωνικό Κέντρο για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (JaCVAM), το ιαπωνικό **Υπουργείο Οικονομίας, Εμπορίου και Βιομηχανίας** (METI), και η Ιαπωνική Εταιρεία Εναλλακτικών Μεθόδων προς τα Πειράματα σε Ζώα (JSAAE), και η οποία υποβλήθηκε στη συνέχεια σε ανεξάρτητη αξιολόγηση από ομοτίμους (3) υπό την αιγίδα του JaCVAM και του ιαπωνικού Υπουργείου Υγείας, Εργασίας και Κοινωνικής Πρόνοιας (MHLW), με την υποστήριξη της **Διεθνούς Συνεργασίας για τις Εναλλακτικές Μεθόδους Δοκιμών** (ICATM). Λαμβανομένου υπόψη του συνόλου των διαθέσιμων στοιχείων και των απόψεων των ρυθμιστικών αρχών και των ενδιαφερόμενων μερών, η δοκιμασία IL-8 Luc θεωρείται χρήσιμη στο πλαίσιο IATA για τη διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών ουσιών με σκοπό την ταξινόμηση και επισήμανση επικινδυνότητας. Παραδείγματα σχετικά με τη χρήση δεδομένων δοκιμασίας IL-8 Luc σε συνδυασμό με άλλα στοιχεία έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία (4) (5) (6).
3. Η δοκιμασία IL-8 Luc αποδείχθηκε ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε εργαστήρια που διαθέτουν εμπειρία στην κυτταροκαλλιέργεια και τη μέτρηση λουσιφεράσης. Η αναπαραγωγικότητα εντός και μεταξύ των εργαστηρίων ήταν 87,7 % και 87,5 %, αντίστοιχα (2). Τα δεδομένα που προέκυψαν από τη μελέτη επικύρωσης (2) και άλλες δημοσιευμένες εργασίες (1) (6) δείχνουν ότι, σε σύγκριση με την LLNA, με τη δοκιμασία IL-8 Luc 118 από τις 143 χημικές ουσίες κρίθηκαν θετικές ή αρνητικές ενώ για 25 χημικές ουσίες η δοκιμή δεν ήταν καταληκτική, και η ορθότητα της δοκιμασίας IL-8 Luc όσον αφορά τη διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών (κατηγορία 1 κατά GHS του OHE / κανονισμό CLP) και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος ουσιών (καμία κατηγορία κατά GHS του OHE / κανονισμό CLP) είναι 86 % (101/118), με ευαισθησία 96 % (92/96) και

ειδικότητα 41 % (9/22). Με εξαίρεση τις ουσίες που δεν εμπίπτουν στο πεδίο εφαρμογής όπως περιγράφεται κατωτέρω (παράγραφος 5), με τη δοκιμασία IL-8 Luc 113 από τις 136 χημικές ουσίες κρίθηκαν θετικές ή αρνητικές ενώ για 23 χημικές ουσίες η δοκιμή δεν ήταν καταληκτική, και η ορθότητα της δοκιμασίας IL-8 Luc είναι 89 % (101/113), με ευαισθησία 96 % (92/96) και ειδικότητα 53 % (9/17). Με χρήση δεδομένων για τον άνθρωπο από τους Urbisch et al. (7), με τη δοκιμασία IL-8 Luc 76 από τις 90 χημικές ουσίες κρίθηκαν θετικές ή αρνητικές ενώ για 14 χημικές ουσίες η δοκιμή δεν ήταν καταληκτική, και η ορθότητα της δοκιμασίας είναι 80 % (61/76), η ευαισθησία 93 % (54/58) και η ειδικότητα 39 % (7/18). Με εξαίρεση τις ουσίες που δεν εμπίπτουν στο πεδίο εφαρμογής της, με τη δοκιμασία IL-8 Luc 71 από τις 84 χημικές ουσίες κρίθηκαν θετικές ή αρνητικές ενώ για 13 χημικές ουσίες η δοκιμή δεν ήταν καταληκτική, και η ορθότητα της δοκιμασίας είναι 86 % (61/71) με ευαισθησία 93 % (54/58) και ειδικότητα 54 % (7/13). Οι ψευδοαρνητικές προβλέψεις με τη δοκιμασία IL-8 Luc αφορούν πιθανότατα χημικές ουσίες που εμφανίζουν χαμηλή έως μέτρια ισχύ ευαισθητοποίησης του δέρματος (υποκατηγορία 1B κατά GHS του OHE / κανονισμό CLP) παρά ουσίες με υψηλή ισχύ (υποκατηγορία 1A κατά GHS του OHE / κανονισμό CLP) (6). Συνολικά, τα στοιχεία υποστηρίζουν τον ρόλο της δοκιμασίας IL-8 Luc στον προσδιορισμό της επικινδυνότητας ευαισθητοποίησης του δέρματος. Οι τιμές ορθότητας που παρέχονται για τη δοκιμασία IL-8 Luc ως αυτοτελή δοκιμή είναι απλώς ενδεικτικές, δεδομένου ότι η δοκιμή θα πρέπει να εξετάζεται σε συνδυασμό με άλλες πηγές πληροφοριών στο πλαίσιο IATA και σύμφωνα με τις πληροφορίες στις παραγράφους 7 και 8 της γενικής εισαγωγής. Επιπλέον, κατά την αξιολόγηση των δοκιμών ευαισθητοποίησης του δέρματος χωρίς χρήση ζώων, θα πρέπει να μη λησμονείται ότι η δοκιμασία LLNA, καθώς και άλλες δοκιμές σε ζώα, ενδέχεται να μην αντικατοπτρίζουν πλήρως την κατάσταση στον άνθρωπο.

4. Με βάση το σύνολο των διαθέσιμων δεδομένων, η δοκιμασία IL-8 Luc είναι εφαρμόσιμη σε υπό δοκιμή χημικές ουσίες που καλύπτουν ποικιλία οργανικών λειτουργικών ομάδων, μηχανισμών αντίδρασης, επιπέδων ισχύος ευαισθητοποίησης του δέρματος (όπως προσδιορίζονται σε μελέτες *in vivo*) και φυσικοχημικών ιδιοτήτων (2) (6).
5. Παρότι στη δοκιμασία IL-8 Luc χρησιμοποιείται ως διαλύτης το X-VIVO™ 15, με τη δοκιμασία IL-8 Luc αξιολογήθηκαν σωστά χημικές ουσίες με Log K_{ow} >3,5 καθώς και χημικές ουσίες με διαλυτότητα γύρω στα 100 µg/ml, όπως υπολογίστηκε με το EPI Suite™, ενώ οι επιδόσεις της όσον αφορά την ανίχνευση ευαισθητοποιητικών ουσιών με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα είναι καλύτερες σε σχέση με τις αντίστοιχες της δοκιμασίας IL-8 Luc με χρήση διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) ως διαλύτη (2). Ωστόσο, αρνητικά αποτελέσματα για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν διαλύονται σε 20 mg/ml ενδέχεται να έχουν ως αποτέλεσμα ψευδοαρνητικά αποτελέσματα, λόγω της μη διαλυτότητάς τους στο X-VIVO™ 15. Ως εκ τούτου, τα αρνητικά αποτελέσματα για τις εν λόγω χημικές ουσίες δεν θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη. Στη μελέτη επικύρωσης διαπιστώθηκε

υψηλό ποσοστό ψευδοαρνητικών αποτελεσμάτων για τους ανυδρίτες. Επιπλέον, λόγω της περιορισμένης μεταβολικής ικανότητας της κυτταρικής σειράς (8) και των πειραματικών συνθηκών, τα μεταβολικά προαπτένια (ουσίες που χρειάζονται μεταβολική ενεργοποίηση) και τα αβιοτικά προαπτένια (ουσίες που ενεργοποιούνται με οξείδωση από τον αέρα) ενδέχεται να δώσουν αρνητικά αποτελέσματα στη δοκιμασία. Ωστόσο, αν και τα αρνητικά αποτελέσματα για τα μεταβολικά/αβιοτικά προαπτένια για τα οποία υπάρχουν οι σχετικές υπόνοιες θα πρέπει να ερμηνεύονται με επιφύλαξη, με τη δοκιμασία IL-8 Luc κρίθηκαν σωστά 11 από 11 αβιοτικά προαπτένια, 6/6 μεταβολικά προαπτένια, και 6/8 αβιοτικά/μεταβολικά προαπτένια στο σύνολο δεδομένων της δοκιμασίας IL-8 Luc (2). Με βάση την πρόσφατη ολοκληρωμένη επισκόπηση τριών δοκιμών χωρίς χρήση ζώων (της DPRA, της KeratinoSens™ και της h-CLAT) ως προς την ικανότητά τους να ανιχνεύουν τα αβιοτικά και μεταβολικά προαπτένια (9), και βάσει του γεγονότος ότι τα κύτταρα THP-G8 που χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία IL-8 Luc αποτελούν κυτταρική σειρά που προκύπτει από την THP-1 που χρησιμοποιείται στην h-CLAT, η δοκιμασία IL-8 Luc μπορεί επίσης να συμβάλει, σε συνδυασμό με άλλες δοκιμές, στην ενίσχυση της ευαισθησίας των δοκιμών χωρίς χρήση ζώων όσον αφορά την ανίχνευση των αβιοτικών και μεταβολικών προαπτενίων. Οι επιφανειοδραστικές ουσίες που έχουν δοκιμαστεί μέχρι σήμερα έδωσαν (ψευδο)θετικά αποτελέσματα, ανεξάρτητα από το είδος τους (π.χ. κατιονικές, ανιονικές ή μη ιονικές). Τέλος, οι χημικές ουσίες που παρεμποδίζουν τη λουσιφεράση μπορεί να προκαλέσουν σύγχυση ως προς τη δράση/μέτρησή της, προκαλώντας είτε φαινομενική αναστολή είτε αυξημένη φωταύγεια (10). Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι συγκεντρώσεις φυτοοιστρογόνων ανώτερες του 1 μΜ παρεμποδίζουν τα σήματα φωταύγειας σε άλλες δοκιμασίες με λουσιφεράση ως γονίδιο αναφοράς, λόγω υπερενεργοποίησης του γονιδίου αναφοράς. Κατά συνέπεια, θα πρέπει να εξετάζεται με προσοχή η έκφραση της λουσιφεράσης σε υψηλές συγκεντρώσεις φυτοοιστρογόνων ή ενώσεων για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες ότι προκαλούν ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης ανάλογη με εκείνη που οφείλεται στα φυτοοιστρογόνα (11). Με βάση τα παραπάνω, τα επιφανειοδραστικά, οι ανυδρίτες και οι χημικές ουσίες που παρεμποδίζουν τη λουσιφεράση δεν εμπίπτουν στο πεδίο εφαρμογής της παρούσας δοκιμασίας. Εάν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η δοκιμασία IL-8 Luc δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε άλλες ειδικές κατηγορίες υπό δοκιμή χημικών ουσιών, η δοκιμή δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τις συγκεκριμένες κατηγορίες.

6. Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, η μέθοδος IL-8 Luc υποστηρίζει τη διάκριση μεταξύ ευαισθητοποιητικών και μη ευαισθητοποιητικών του δέρματος. Για να προσδιοριστεί το κατά πόσον τα αποτελέσματα της IL-8 Luc μπορούν να συμβάλουν στην εκτίμηση της ισχύος, όταν αυτή πραγματοποιείται σε συνδυασμό με άλλες πηγές πληροφοριών, απαιτούνται περαιτέρω εργασίες, κατά προτίμηση με βάση δεδομένα για τον άνθρωπο.
7. Οι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 3.1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

8. Στη δοκιμασία IL-8 Luc γίνεται χρήση ανθρώπινης κυτταρικής σειράς μονοκυτταρικής λευχαιμίας, της THP-1, η οποία ελήφθη από τη συλλογή American Type Culture Collection (Manassas, VA, ΗΠΑ). Με χρήση της εν λόγω κυτταρικής σειράς, το τμήμα δερματολογίας της ιατρικής σχολής του πανεπιστημίου του Tohoku δημιούργησε μια κυτταρική σειρά γονιδίου αναφοράς IL-8 προερχόμενη από την THP-1, την THP-G8, η οποία φέρει τα γονίδια σταθερής λουσιφεράσης πορτοκαλί χρώματος (SLO) και σταθερής λουσιφεράσης κόκκινου χρώματος (SLR) υπό τον έλεγχο των υποκινητών της IL-8 και της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH) αντίστοιχα (1). Αυτό επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό της επαγωγής του γονιδίου λουσιφεράσης μέσω ανίχνευσης της φωταύγειας από καθιερωμένα φωταυγή υποστρώματα λουσιφεράσης ως δείκτη της δραστηριότητας της IL-8 και της GAPDH στα κύτταρα μετά από έκθεση σε ευαισθητοποιητικές χημικές ουσίες.
9. Το σύστημα δοκιμασίας δύο χρωμάτων περιλαμβάνει λουσιφεράση που εκπέμπει πορτοκαλί χρώμα (SLO, λμέγ. = 580 nm) (12) για τη γονιδιακή έκφραση του υποκινητή IL-8, και λουσιφεράση που εκπέμπει κόκκινο χρώμα (SLR, λμέγ. = 630 nm) (13) για τη γονιδιακή έκφραση του υποκινητή εσωτερικού μάρτυρα, GAPDH. Οι δύο λουσιφεράσες εκπέμπουν διαφορετικά χρώματα όταν αντιδρούν με την d-λουσιφερίνη της πυγολαμπίδας και η φωταύγειά τους μετράται ταυτόχρονα σε αντίδραση ενός σταδίου, μέσω διαχωρισμού του φωτός που εκπέμπεται από το μείγμα της δοκιμασίας με χρήση οπτικού φίλτρου (14) (προσάρτημα 3.2).
10. Τα κύτταρα THP-G8 υποβάλλονται σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία επί 16 ώρες και, στη συνέχεια, μετράται η δραστηριότητα της λουσιφεράσης SLO (SLO-LA) που αντικατοπτρίζει τη δραστηριότητα του υποκινητή IL-8 και η δραστηριότητα της λουσιφεράσης SLR (SLR-LA) που αντικατοπτρίζει τη δραστηριότητα του υποκινητή GAPDH. Προκειμένου να διευκολυνθεί η κατανόηση των συντομογραφιών, τα SLO-LA και SLR-LA αναφέρονται ως IL8LA και GAPLA αντίστοιχα. Στον πίνακα 1 παρέχεται περιγραφή των όρων που σχετίζονται με τη δραστηριότητα της λουσιφεράσης στη δοκιμασία IL-8 Luc. Οι μετρηθείσες τιμές χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της κανονικοποιημένης IL8LA (nIL8LA), η οποία αντιστοιχεί στον λόγο IL8LA προς GAPLA· της επαγωγής της nIL8LA (Ind-IL8LA), η οποία αντιστοιχεί στον λόγο των αριθμητικών μέσων όρων των εις τετραπλούν μετρηθεισών τιμών της nIL8LA των κυττάρων THP-G8 που υποβλήθηκαν σε αγωγή με υπό δοκιμή χημική ουσία προς τις τιμές της nIL8LA των κυττάρων THP-G8 χωρίς αγωγή· και της αναστολής της GAPLA (Inh-GAPLA), η οποία αντιστοιχεί στον λόγο των αριθμητικών μέσων όρων των εις τετραπλούν μετρηθεισών τιμών της GAPLA των κυττάρων THP-G8 που υποβλήθηκαν σε

αγωγή με υπό δοκιμή χημική ουσία προς τις τιμές της GAPLA των κυττάρων THP-G8 χωρίς αγωγή, η οποία χρησιμοποιείται ως δείκτης κυτταροτοξικότητας.

Πίνακας 1: Περιγραφή των όρων που σχετίζονται με τη δράση της λουσιφεράσης στη δοκιμασία IL-8 Luc

Συντομογραφίες	Ορισμός
GAPLA	δραστικότητα της λουσιφεράσης SLR που αντικατοπτρίζει τη δραστικότητα του υποκινητή GAPDH
IL8LA	δραστικότητα της λουσιφεράσης SLO που αντικατοπτρίζει τη δραστικότητα του υποκινητή IL-8
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA των κυττάρων THP-G8 που υποβάλλονται σε αγωγή με χημικές ουσίες / nIL8LA κυττάρων χωρίς αγωγή
Inh-GAPLA	GAPLA των κυττάρων THP-G8 που υποβάλλονται σε αγωγή με χημικές ουσίες / GAPLA κυττάρων χωρίς αγωγή
CV05	η χαμηλότερη συγκέντρωση της χημικής ουσίας στην οποία η Inh-GAPLA καθίσταται < 0,05.

11. Υπάρχουν διαθέσιμα πρότυπα επιδόσεων (PS) (15) που διευκολύνουν την επικύρωση των τροποποιημένων *in vitro* δοκιμών λουσιφεράσης IL-8 που είναι παρεμφερείς με τη δοκιμασία IL-8 Luc και επιτρέπουν την έγκαιρη τροποποίηση της κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών 442E του ΟΟΣΑ, ούτως ώστε να τις συμπεριλάβει. Η αμοιβαία αποδοχή δεδομένων (Mutual Acceptance of Data/MAD) του ΟΟΣΑ είναι διασφαλισμένη μόνο για δοκιμές που έχουν επικυρωθεί σύμφωνα με τα πρότυπα επιδόσεων, εφόσον αυτές έχουν κριθεί από τον ΟΟΣΑ και έχουν περιληφθεί στην κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 442E (16).

ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

12. Πριν χρησιμοποιήσουν στην καθημερινή πρακτική τη δοκιμή που περιγράφεται στο παρόν προσάρτημα της μεθόδου δοκιμών B.71, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα, χρησιμοποιώντας τις 10 ουσίες ελέγχου ικανότητας του προσαρτήματος 3.3 σύμφωνα με τις ορθές πρακτικές *in vitro* μεθόδων (17). Επιπλέον, οι χρήστες της δοκιμής θα πρέπει να διατηρούν βάση ιστορικών δεδομένων με τα δεδομένα που προκύπτουν από τους ελέγχους δραστικότητας (βλ. παράγραφο 15) και με τους θετικούς μάρτυρες και τους μάρτυρες με διαλύτη/φορέα (βλ. παραγράφους 21-24), και θα πρέπει να χρησιμοποιούν τα εν λόγω δεδομένα για να βεβαιώνονται για τη διαχρονική αναπαραγωγικότητα της δοκιμής στο εργαστήριό τους.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

13. Υπάρχει διαθέσιμη τυποποιημένη διαδικασία λειτουργίας (SOP) για τη δοκιμασία IL-8 Luc, η οποία θα πρέπει να χρησιμοποιείται κατά τη διεξαγωγή της (18). Τα εργαστήρια που επιθυμούν να διεξάγουν τη δοκιμή μπορούν να προμηθευτούν την ανασυνδυασμένη κυτταρική σειρά THP-G8 από την GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Ιαπωνία, κατόπιν υπογραφής συμφωνίας μεταφοράς υλικού (ΣΜΥ) σύμφωνα με τις προϋποθέσεις του υποδείγματος του ΟΟΣΑ. Στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται τα βασικά στοιχεία και διαδικασίες της δοκιμασίας.

Προπαρασκευή των κυττάρων

14. Για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας IL-8 Luc θα πρέπει να χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά THP-G8 από την GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Ιαπωνία (βλ. παραγράφους 8 και 13). Κατά την παραλαβή, τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται (2 έως 4 ανακαλλιέργειες) και φυλάσσονται στην κατάψυξη ως ομοιογενές απόθεμα. Τα κύτταρα του αποθέματος αυτού μπορούν να πολλαπλασιάζονται μέχρι και επί 12 ανακαλλιέργειες ή επί 6 εβδομάδες. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό είναι το RPMI-1640 που περιέχει 10 % βόειου εμβρυϊκού ορού (FBS), αντιβιοτικό/αντιμυκητιακό διάλυμα (100 U/ml πενικιλίνης G, 100 µg/ml στρεπτομυκίνης και 0,25 µg/ml αμφοτερικίνης B σε αλατούχο διάλυμα 0,85 %) (π.χ. GIBCO αρ. κατ. 15240-062), 0,15 µg/ml πουρομυκίνης (π.χ. CAS:58-58-2) και 300 µg/ml G418 (π.χ. CAS:108321-42-2).
15. Πριν από τη χρήση τους στη δοκιμή, θα πρέπει να ελέγχεται εάν τα κύτταρα πληρούν τα κριτήρια μέσω της διεξαγωγής ελέγχου δραστηριότητας. Ο εν λόγω έλεγχος θα πρέπει να διεξάγεται 1-2 εβδομάδες ή 2-4 ανακαλλιέργειες μετά την απόψυξη, με χρήση του θετικού μάρτυρα 1-βρωμομεθυλο-4-νιτροβενζόλιο (4-NBB) (CAS:100-11-8, καθαρότητα ≥ 99 %) και του αρνητικού μάρτυρα γαλακτικό οξύ (LA) (CAS:50-21-5, καθαρότητα ≥ 85 %). Το 4-NBB θα πρέπει να επάγει θετική απόκριση στην Ind-IL8LA ($\geq 1,4$), ενώ το LA θα πρέπει να επάγει αρνητική απόκριση στην Ind-IL8LA ($< 1,4$). Για τη δοκιμασία χρησιμοποιούνται μόνο τα κύτταρα που έχουν υποβληθεί επιτυχώς στον έλεγχο δραστηριότητας. Ο έλεγχος θα πρέπει να διενεργείται σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στις παραγράφους 22-24.
16. Για τη δοκιμή, τα κύτταρα THP-G8 εμβολιάζονται σε πυκνότητα 2 έως 5×10^5 κύτταρα/ml και προκαλλιεργούνται σε φιάλες καλλιέργειας επί 48 έως 96 ώρες. Την ημέρα διεξαγωγής της δοκιμής, τα κύτταρα που συλλέγονται από τη φιάλη καλλιέργειας εκπλένονται με RPMI-1640 που περιέχει 10 % FBS χωρίς αντιβιοτικά και, στη συνέχεια, επανεναιωρούνται με RPMI-1640 που περιέχει 10 % FBS χωρίς αντιβιοτικά σε πυκνότητα 1×10^6 κύτταρα/ml. Στη συνέχεια, τα κύτταρα κατανέμονται σε μαύρο τρυβλίο επίπεδης βάσης 96 κοιλοτήτων (π.χ. Costar αρ. κατ. 3603) με 50 µl (5×10^4 κύτταρα/κοιλοότητα).

Παρασκευή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων

17. Η παρασκευή των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των μαρτύρων γίνεται την ημέρα της δοκιμής. Για τη δοκιμασία IL-8 Luc, οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες διαλύονται σε X-VIVO™ 15, ένα θρεπτικό μέσο του εμπορίου χωρίς ορό (Lonza, 04-418Q), σε τελική

σ

υ

γ

κ

έ

ν

τ

ρ

ω

σ

η

2

0

18. Ο σκοπός της πρώτης σειράς δοκιμών είναι ο προσδιορισμός της κυτταροτοξικής συγκέντρωσης και η εξέταση της ισχύος δερματικής ευαισθητοποίησης των χημικών ουσιών. Με χρήση X-VIVO™ 15, πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις των αποθεματικών διαλυμάτων X-VIVO™ 15 των υπό δοκιμή χημικών ουσιών με συντελεστή αραιώσης 2 (βλ. προσάρτημα 3.5) και με χρήση τρυβλίου δοκιμασίας 96 κοιλοτήτων (π.χ. Costar αρ. κατ. EW-01729-03). Στη συνέχεια, προστίθενται 50 µl/κοιλότητα αραιωμένου διαλύματος σε 50 µl του εναιωρήματος κυττάρων σε μαύρο τρυβλίο επίπεδης βάσης 96 κοιλοτήτων. Έτσι, για υπό δοκιμή χημικές ουσίες που είναι διαλυτές σε X-VIVO™ 15, οι τελικές συγκεντρώσεις των υπό δοκιμή χημικών ουσιών κυμαίνονται από 0,002 έως 2 mg/ml (προσάρτημα 3.5). Για υπό δοκιμή ουσίες που δεν είναι διαλυτές σε X-VIVO™ 15 στα 20 mg/ml, ορίζονται μόνο συντελεστές αραιώσης από 2 έως 2¹⁰, παρότι οι πραγματικές τελικές συγκεντρώσεις των υπό δοκιμή χημικών ουσιών παραμένουν αμείβολες και εξαρτώνται από τη συγκέντρωση κορεσμού των υπό δοκιμή χημικών ουσιών στο αποθεματικό διάλυμα X-VIVO™ 15.

19. Σε επακόλουθες σειρές δοκιμών (δεύτερο, τρίτο και τέταρτο πανομοιότυπο δείγμα), το αποθεματικό διάλυμα X-VIVO™ 15 παρασκευάζεται σε συγκέντρωση 4 φορές υψηλότερη από τη συγκέντρωση κυτταρικής βιωσιμότητας 05 (CV05, η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία η Inh-GAPLA καθίσταται <0,05) στο πρώτο πείραμα. Εάν η Inh-GAPLA δεν μειωθεί κάτω από 0,05 στην υψηλότερη συγκέντρωση κατά την πρώτη σειρά δοκιμών, το αποθεματικό διάλυμα X-VIVO™ 15 παρασκευάζεται στην υψηλότερη συγκέντρωση της

V

I

500

15 σε 20 mg της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ανεξάρτητα από τη διαλυτότητα της χημικής ουσίας) σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης και συμπληρώνεται μέχρι όγκου 1 ml και, στη συνέχεια, το διάλυμα περιδινείται έντονα και ανακινείται σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα σε μέγιστη ταχύτητα 8 σ.α.λ. επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος 20°C περίπου.

πρώτης σειράς δοκιμών. Η συγκέντρωση της CV05 υπολογίζεται διαιρώντας τη συγκέντρωση του αποθεματικού διαλύματος στην πρώτη σειρά δοκιμών με συντελεστή αραιώσης για την CV05 (X) [συντελεστής αραιώσης CV05 (X)· ο συντελεστής αραιώσης που απαιτείται για την αραιώση του αποθεματικού διαλύματος στην CV05] (βλ. προσάρτημα 3.5). Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν είναι διαλυτές σε X-VIVO σε 20 mg/ml, η CV05 προσδιορίζεται βάσει της συγκέντρωσης του αποθεματικού διαλύματος $\times 1/X$. Για τις σειρές δοκιμών 2 έως 4, παρασκευάζεται δεύτερο αποθεματικό διάλυμα ως 4 $\times$ CV50 (προσάρτημα 3.5).

20. Παρασκευάζονται διαδοχικές αραιώσεις των δεύτερων αποθεματικών διαλυμάτων X-VIVO™ 15 με συντελεστή αραιώσης 1,5, με χρήση τρυβλίου δοκιμασίας 96 κοιλοτήτων. Στη συνέχεια, προστίθενται 50 μ l/κοιλότητα αραιωμένου διαλύματος σε 50 μ l του εναιωρήματος κυττάρων στο μαύρο τρυβλίο επίπεδης βάσης 96 κοιλοτήτων. Κάθε συγκέντρωση κάθε υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή σε 4 κοιλότητες. Στη συνέχεια, τα μείγματα αναμιγνύονται σε αναδευτήρα τρυβλίων και επωάζονται επί 16 ώρες στους 37°C και με 5 % CO₂, και, κατόπιν, μετράται η δράση της λουσιφεράσης σύμφωνα με τα όσα ορίζονται κατωτέρω.
21. Ο μάρτυρας με διαλύτη είναι το μείγμα 50 μ l/κοιλότητα X-VIVO™ 15 και 50 μ l/κοιλότητα εναιωρήματος κυττάρων σε RPMI-1640 που περιέχει 10 % FBS.
22. Ο συνιστώμενος θετικός μάρτυρας είναι το 4-NBB. Παρασκευάζονται 20 mg 4-NBB σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης των 1,5 ml, στο οποίο προστίθεται έως 1 ml X-VIVO™ 15. Το σωληνάριο περιδινείται έντονα και ανακινείται σε περιστροφικό αναδευτήρα σε μέγιστη ταχύτητα 8 σ.α.λ. επί τουλάχιστον 30 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρωση σε 20 000g επί 5 λεπτά, το υπερκείμενο υγρό αραιώνεται κατά 4 φορές με X-VIVO™ 15, και 500 μ l του αραιωμένου υπερκείμενου υγρού μεταφέρονται σε κοιλότητα τρυβλίου 96 κοιλοτήτων. Το αραιωμένο υπερκείμενο υγρό αραιώνεται περαιτέρω με X-VIVO™ 15 κατά 2 και 4 φορές, και 50 μ l του διαλύματος προστίθενται σε 50 μ l εναιωρήματος κυττάρων THP-G8 στις κοιλότητες μαύρου τρυβλίου 96 κοιλοτήτων με επίπεδη βάση (προσάρτημα 3.6). Κάθε συγκέντρωση του θετικού μάρτυρα θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή σε 4 κοιλότητες. Το τρυβλίο αναδεύεται σε αναδευτήρα τρυβλίων και επωάζεται σε επωαστήρα CO₂ επί 16 ώρες (37°C, 5 % CO₂), και, στη συνέχεια, μετράται η δράση της λουσιφεράσης σύμφωνα με τα όσα ορίζονται στην παράγραφο 29.
23. Ο συνιστώμενος αρνητικός μάρτυρας είναι το LA. Παρασκευάζονται 20 mg LA σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης των 1,5 ml, στο οποίο προστίθεται έως 1 ml X-VIVO™ 15 (20 mg/ml). 20 mg/ml διαλύματος LA αραιώνονται κατά 5 φορές με X-VIVO™ 15 (4 mg/ml) και 500 μ l από αυτό το διάλυμα 4 mg/ml μεταφέρονται σε κοιλότητα τρυβλίου 96 κοιλοτήτων. Αυτό το διάλυμα αραιώνεται κατά 2 φορές με X-VIVO™ 15, και, στη συνέχεια, αραιώνεται και πάλι κατά 2 φορές για να προκύψουν διαλύματα 2 mg/ml και 1

mg/ml. 50 µl από αυτά τα 3 διαλύματα και τον μάρτυρα με φορέα (X-VIVO™ 15) προστίθενται σε 50 µl εναιωρήματος κυττάρων THP-G8 στις κοιλότητες μαύρου τρυβλίου 96 κοιλοτήτων με επίπεδη βάση. Κάθε συγκέντρωση του αρνητικού μάρτυρα υποβάλλεται σε δοκιμή σε 4 κοιλότητες. Το τρυβλίο αναδεύεται σε αναδευτήρα τρυβλίων και επωάζεται σε επωαστήρα CO₂ επί 16 ώρες (37°C, 5 % CO₂), και, στη συνέχεια, μετράται η δραστηριότητα της λουσιφεράσης σύμφωνα με τα όσα ορίζονται στην παράγραφο 29.

24. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι κατάλληλοι θετικοί ή αρνητικοί μάρτυρες, εάν υπάρχουν διαθέσιμα ιστορικά δεδομένα από τα οποία μπορούν να προκύψουν συγκρίσιμα κριτήρια αποδοχής σειρών δοκιμών.
25. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την αποφυγή της εξάτμισης των πτητικών υπό δοκιμή χημικών ουσιών, καθώς και της διασταυρούμενης μόλυνσης των μικροκοιλοτήτων από τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες, π.χ. με στεγανοποίηση του τρυβλίου πριν από την επώαση με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες.
26. Για να προκύψει θετική ή αρνητική πρόβλεψη, απαιτείται η διεξαγωγή 2 έως 4 σειρών δοκιμών με τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες και τον μάρτυρα με διαλύτη (βλ. πίνακα 2). Κάθε σειρά δοκιμών πραγματοποιείται διαφορετική ημέρα με πρόσφατο αποθεματικό διάλυμα υπό δοκιμή χημικών ουσιών σε X-VIVO™ 15 και με κύτταρα που έχουν συλλεγεί ανεξάρτητα. Τα κύτταρα μπορούν να προέρχονται από την ίδια ανακαλλιέργεια.

Μετρήσεις της δραστηριότητας λουσιφεράσης

27. Η φωταύγεια μετράται με χρήση λουμινόμετρου τρυβλίων μικροτιτλοδότησης 96 κοιλοτήτων εξοπλισμένου με οπτικά φίλτρα, π.χ. Phelios (ATTO, Tokyo, Ιαπωνία), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Γερμανία) και η σειρά ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, ΗΠΑ). Το λουμινόμετρο πρέπει να βαθμονομείται για κάθε δοκιμή προκειμένου να διασφαλίζεται η αναπαραγωγιμότητα (19). Για την εν λόγω βαθμονόμηση διατίθενται ανασυνδυασμένες λουσιφεράσες που εκπέμπουν πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα.
28. 100 µl προθερμασμένου αντιδραστηρίου δοκιμασίας Tripluc® Luciferase (Tripluc) μεταφέρονται σε κάθε κοιλότητα του τρυβλίου που περιέχει το εναιώρημα κυττάρων που υποβάλλεται σε αγωγή με ή χωρίς τη χημική ουσία. Το τρυβλίο ανακινείται επί 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος περίπου 20°C. Το τρυβλίο τοποθετείται στο λουμινόμετρο για να μετρηθεί η δραστηριότητα της λουσιφεράσης. Μετράται η βιοφωταύγεια επί 3 δευτερόλεπτα, τόσο απουσία (F0) όσο και παρουσία (F1) του οπτικού φίλτρου. Η χρήση εναλλακτικών συνθηκών θα πρέπει να τεκμηριώνεται επιστημονικά, π.χ. ανάλογα με το μοντέλο του χρησιμοποιούμενου λουμινόμετρου.
29. Οι παράμετροι για κάθε συγκέντρωση υπολογίζονται βάσει των μετρούμενων τιμών, π.χ. των IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, του μέσου όρου ±SD της IL8LA,

του μέσου όρου $\pm$ SD της GAPLA, του μέσου όρου $\pm$ SD της nIL8LA, του μέσου όρου $\pm$ SD της Ind-IL8LA, του μέσου όρου $\pm$ SD της Inh-GAPLA, του διαστήματος εμπιστοσύνης σε επίπεδο 95 % της Ind-IL8LA. Οι ορισμοί των παραμέτρων που χρησιμοποιούνται στην παρούσα παράγραφο παρέχονται στα προσαρτήματα I και IV.

30. Πριν από τη μέτρηση, η διάκριση των χρωμάτων στο πλαίσιο δοκιμασιών με γονίδια αναφοράς πολλών χρωμάτων πραγματοποιείται συνήθως με χρήση συσκευών ανίχνευσης (λουμινόμετρο και συσκευή ανάγνωσης τρυβλίων) που διαθέτουν οπτικά φίλτρα, όπως φίλτρα αποκοπής (υπερατρά ή χαμηλοπερατά) ή φίλτρα ζώνης διέλευσης. Πριν από τη δοκιμή, οι συντελεστές περατότητας των φίλτρων για κάθε χρώμα σήματος βιοφωταύγειας θα πρέπει να βαθμονομούνται, σύμφωνα με το προσάρτημα 3.2.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αξιολόγηση των δεδομένων

31. Βάσει των κριτηρίων για τη λήψη απόφασης περί θετικής/αρνητικής πρόβλεψης, σε κάθε σειρά δοκιμών απαιτείται:
- μια δοκιμασία πρόβλεψης IL-8 Luc να κρίνεται θετική εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία έχει Ind-IL8LA $\geq 1,4$ και το κατώτερο όριο του διαστήματος εμπιστοσύνης 95 % της Ind-IL8LA είναι $\geq 1,0$
 - μια δοκιμασία πρόβλεψης IL-8 Luc να κρίνεται αρνητική εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία έχει Ind-IL8LA $< 1,4$ και/ή το κατώτερο όριο του διαστήματος εμπιστοσύνης 95 % της Ind-IL8LA είναι $< 1,0$.

Μοντέλο πρόβλεψης

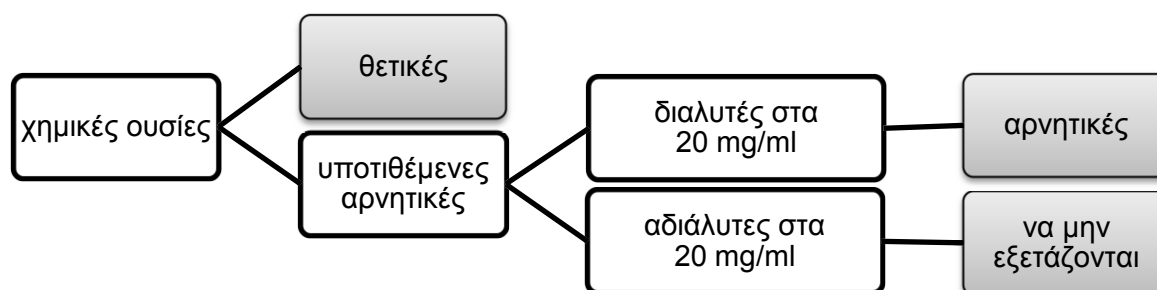
32. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες από τις οποίες προκύπτουν δύο θετικά αποτελέσματα από την 1η, 2η, 3η ή 4η σειρά δοκιμών χαρακτηρίζονται θετικές, ενώ εκείνες από τις οποίες προκύπτουν τρία αρνητικά αποτελέσματα από την 1η, 2η, 3η ή 4η σειρά δοκιμών χαρακτηρίζονται υποτιθέμενες αρνητικές (πίνακας 2). Μεταξύ των υποτιθέμενων αρνητικών χημικών ουσιών, οι χημικές ουσίες που διαλύονται σε 20 mg/ml X-VIVO™ 15 κρίνονται αρνητικές, ενώ οι χημικές ουσίες που δεν διαλύονται σε 20 mg/ml X-VIVO™ 15 δεν θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη (σχήμα 1).

Πίνακας 2: Κριτήρια για τον προσδιορισμό των θετικών και των υποτιθέμενων αρνητικών χημικών ουσιών

1η σειρά δοκιμών	2η σειρά δοκιμών	3η σειρά δοκιμών	4η σειρά δοκιμών	Τελική πρόβλεψη
Θετική	Θετική	-	-	Θετική
	Αρνητική	Θετική	-	Θετική

		Αρνητική	Θετική	Θετική
			Αρνητική	Υποτιθέμενη αρνητική
Αρνητική	Θετική	Θετική	-	Θετική
		Αρνητική	Θετική	Θετική
	Αρνητική	Θετική	Αρνητική	Υποτιθέμενη αρνητική
			Θετική	Θετική
	Αρνητική	Αρνητική	Θετική	Υποτιθέμενη αρνητική
			-	Υποτιθέμενη αρνητική

Σχήμα 1: Μοντέλο πρόβλεψης για την τελική κρίση



Κριτήρια αποδοχής

33. Όταν χρησιμοποιείται η δοκιμασία IL-8 Luc θα πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια αποδοχής:

- Η Ind-IL8LA θα πρέπει να υπερβαίνει το 5,0 σε μία τουλάχιστον συγκέντρωση του θετικού μάρτυρα, 4-NBB, σε κάθε σειρά δοκιμών.
- Η Ind-IL8LA θα πρέπει να είναι χαμηλότερη από 1,4 σε όλες τις συγκεντρώσεις του αρνητικού μάρτυρα, του γαλακτικού οξέος, σε κάθε σειρά δοκιμών.
- Δεδομένα από τρυβλία για τα οποία η GAPLA κοιλοτήτων μάρτυρα με κύτταρα και Tripluc αλλά χωρίς χημικές ουσίες είναι μικρότερη από 5 φορές την αντίστοιχη GAPLA κοιλοτήτας που περιέχει μόνο θρεπτικό μέσο δοκιμής (50 μl/κοιλότητα RPMI-1640 που περιέχει 10 % FBS και 50 μl/κοιλότητα X-VIVO™ 15) θα πρέπει να απορρίπτονται.
- Δεδομένα από τρυβλία για τα οποία η Inh-GAPLA όλων των συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών ή των χημικών ουσιών μάρτυρα είναι μικρότερη από 0,05 θα

πρέπει να απορρίπτονται. Σε αυτήν την περίπτωση, η πρώτη δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται, ώστε η υψηλότερη τελική συγκέντρωση της επαναλαμβανόμενης δοκιμής να είναι η χαμηλότερη τελική συγκέντρωση της προηγούμενης δοκιμής.

Έκθεση δοκιμής

34. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημικές ουσίες

Μονοσυστατική ουσία:

- ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,
- φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα, μοριακό βάρος και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, εφόσον είναι διαθέσιμα,
- καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,
- κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),
- διαλυτότητα στο X-VIVO™ 15. Για τις χημικές ουσίες που δεν είναι διαλυτές στο X-VIVO™ 15, κατά πόσον παρατηρείται σχηματισμός ιζήματος ή επίπλευση μετά τη φυγοκέντρωση,
- ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,
- συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,
- αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία, εάν δεν έχει χρησιμοποιηθεί X-VIVO™ 15.

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγμα:

- χαρακτηρισμός, στο μέτρο του δυνατού, π.χ. χημική ταυτότητα (βλ. ανωτέρω), καθαρότητα, ποσότητα και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες (βλ. ανωτέρω) των συστατικών, εφόσον είναι διαθέσιμα,
- φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, εφόσον είναι διαθέσιμα,
- μοριακό βάρος ή φαινόμενο μοριακό βάρος στην περίπτωση των μειγμάτων/πολυμερών γνωστής σύνθεσης ή άλλες πληροφορίες που έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης,
- κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),

- διαλυτότητα στο X-VIVO™ 15. Για τις χημικές ουσίες που δεν είναι διαλυτές στο X-VIVO™ 15, κατά πόσον παρατηρείται σχηματισμός ιζήματος ή επίπλευση μετά τη φυγοκέντρωση,
- ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,
- συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,
- αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία, εάν δεν έχει χρησιμοποιηθεί X-VIVO™ 15.

Μάρτυρες

Θετικός μάρτυρας:

- ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,
- φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα, μοριακό βάρος και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, στο μέτρο του δυνατού και ανάλογα με την περίπτωση,
- καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,
- κατεργασία πριν από τη δοκιμή, εάν ισχύει (π.χ. θέρμανση, λειοτρίβηση),
- ελεγχθείσα συγκέντρωση/-εις,
- συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,
- παραπομπή σε ιστορικά αποτελέσματα θετικών μαρτύρων που καταδεικνύουν την εφαρμογή κατάλληλων κριτηρίων αποδοχής, εάν ισχύει.

Αρνητικός μάρτυρας:

- ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία/-ες IUPAC ή CAS, αριθμός/-οί CAS και/ή άλλα αναγνωριστικά στοιχεία,
- καθαρότητα, χημική ταυτότητα των προσμείξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ.,
- φυσική εμφάνιση, μοριακό βάρος, καθώς και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, σε περίπτωση χρήσης άλλων αρνητικών μαρτύρων εκτός εκείνων που αναφέρονται στην κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών και εφόσον είναι διαθέσιμες,
- συνθήκες φύλαξης και σταθερότητα, εφόσον είναι διαθέσιμα,
- αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη για κάθε υπό δοκιμή χημική ουσία.

Συνθήκες δοκιμής

- όνομα και διεύθυνση του χορηγού, της εγκατάστασης δοκιμών και του διευθυντή της μελέτης,
- περιγραφή της χρησιμοποιούμενης δοκιμής,
- κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε, συνθήκες φύλαξης και προέλευσή της (π.χ. εγκατάσταση προέλευσης),
- αριθμός παρτίδας και προέλευση του FBC, όνομα προμηθευτή, αριθμός παρτίδας μαύρου τρυβλίου με επίπεδη βάση 96 κοιλοτήτων, και αριθμός παρτίδας αντιδραστηρίου Tripluc,
- αριθμός ανακαλλιεργειών και πυκνότητα κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή,
- μέθοδος καταμέτρησης κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό πριν από τη δοκιμή και τα μέτρα που εφαρμόστηκαν για να εξασφαλιστεί ομοιογενής κατανομή του αριθμού κυττάρων,
- χρησιμοποιούμενο λουμινόμετρο (π.χ. μοντέλο), με τις ρυθμίσεις του οργάνου, χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα λουσιφεράσης και απόδειξη της ενδεδειγμένης ποιότητας των μετρήσεων φωταύγειας με βάση τη δοκιμή ποιοτικού ελέγχου που περιγράφεται στο προσάρτημα 3.2,
- διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για την απόδειξη της τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου όσον αφορά την εφαρμογή της δοκιμής (π.χ. με δοκιμές των ουσιών ελέγχου ικανότητας) ή για την απόδειξη της διαχρονικής αναπαραγωγιμότητας των επιδόσεων της δοκιμής.

Διαδικασία δοκιμής

- αριθμός πανομοιότυπων δειγμάτων και σειρών δοκιμών που διεξήχθησαν,
- συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, διαδικασία εφαρμογής και χρόνος έκθεσης (εάν διαφέρουν από τα συνιστώμενα),
- περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αξιολόγησης και λήψης αποφάσεων,
- περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αποδοχής της μελέτης,
- περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμής.

Αποτελέσματα

- μετρήσεις της IL8LA και της GAPLA,
- υπολογισμοί για τις nIL8LA, Ind-IL8LA και Inh-GAPLA,
- το διάστημα εμπιστοσύνης 95 % της Ind-IL8LA,

- γραφική παράσταση των καμπυλών δόσης-απόκρισης για την επαγωγή δραστικότητας λουσιφεράσης και τη βιωσιμότητα των κυττάρων,
- περιγραφή κάθε άλλης σχετικής παρατήρησης, κατά περίπτωση.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

- εξέταση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας IL-8 Luc,
- εξέταση των αποτελεσμάτων δοκιμασίας στο πλαίσιο IATA, εάν υπάρχουν σχετικές πληροφορίες.

Συμπέρασμα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and 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) 2OECD (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 and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: <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. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: <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. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: <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, and 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, and 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, and 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). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

- (9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and 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, and 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, and 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, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and 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, and 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). To be published - 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. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:
http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.

- (18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Διαθέσιμο στη διεύθυνση
http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.
- (19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and 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: Series on Testing and Assessment No. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OECD, Paris, France.
- (21) United Nations (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. Διαθέσιμο στη διεύθυνση:
http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Προσάρτημα 3.1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Ορθότητα: ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της δοκιμής και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί κριτήριο επιδόσεων της δοκιμής και μια από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας δοκιμής (16).

AOP (Adverse Outcome Pathway): πορεία δυσμενούς έκβασης: αλληλουχία συμβάντων, από τη χημική δομή της στοχευόμενης χημικής ουσίας ή ομάδας ομοειδών χημικών ουσιών και το μοριακό εναρκτήριο συμβάν μέχρι την εξεταζόμενη έκβαση *in vivo* (20).

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

CV05: κυτταρική βιωσιμότητα 05, δηλ. η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία οι χημικές ουσίες εμφανίζουν Inh-GAPLA κάτω του 0,05.

FInSLO-LA: συντομογραφία που χρησιμοποιήθηκε στην έκθεση επικύρωσης και σε προηγούμενες δημοσιεύσεις σχετικά με τη δοκιμασία IL-8 Luc, η οποία αναφέρεται στην Ind-IL8LA. Για τον ορισμό, βλ. Ind-IL8LA.

GAPLA: η δράση της σταθερής λουσιφεράσης κόκκινου χρώματος (SLR) (λμέγ. = 630 nm), η οποία ρυθμίζεται από τον υποκινητή GAPDH και αντιπροσωπεύει την κυτταρική βιωσιμότητα και τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων.

Επικινδυνότητα: εγγενής ιδιότητα ενός παράγοντα ή μιας κατάστασης που μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις όταν ένας οργανισμός, ένα σύστημα ή ένας (υπο)πληθυσμός εκτίθεται στον παράγοντα.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή δοκιμών και την αξιολόγηση: δομημένη προσέγγιση που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας (δυναμικό), τον χαρακτηρισμό της επικινδυνότητας (ισχύς) και/ή την εκτίμηση της ασφάλειας (δυναμικό/ισχύς και έκθεση) μιας χημικής ουσίας ή ομάδας χημικών ουσιών, στην οποία ενσωματώνονται και σταθμίζονται στρατηγικά όλα τα σχετικά δεδομένα, με σκοπό την τροφοδότηση κανονιστικών αποφάσεων σχετικά με τη δυνητική επικινδυνότητα και/ή τον κίνδυνο και/ή την ανάγκη για περαιτέρω στοχευμένες και, ως εκ τούτου, ελάχιστες δοκιμές.

II-SLR-LA: συντομογραφία που χρησιμοποιήθηκε στην έκθεση επικύρωσης και σε προηγούμενες δημοσιεύσεις σχετικά με τη δοκιμασία IL-8 Luc, η οποία αναφέρεται στην Inh-GAPLA. Για τον ορισμό, βλ. Inh-GAPLA.

IL-8 (ιντερλευκίνη 8): κυτταροκίνη που προέρχεται από ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, κερατινοκύτταρα, μακροφάγα, και μονοκύτταρα που προκαλούν χημειοταξία των ουδετερόφιλων και των T λεμφοκυττάρων.

IL8LA: η δραστηριότητα της σταθερής λουσιφεράσης πορτοκαλί χρώματος (SLO) (λμέγ. = 580 nm), η οποία ρυθμίζεται από τον υποκινητή IL-8.

Ind-IL8LA: βαθμός επαγωγής της IL8LA. Λαμβάνεται με διαίρεση της nIL8LA των κυττάρων THP-G8 που υποβάλλονται σε αγωγή με χημικές ουσίες διά της αντίστοιχης μη διεγερμένων κυττάρων THP-G8 και αντιπροσωπεύει την επαγωγή της δραστηριότητας του υποκινητή IL-8 από τις χημικές ουσίες.

Inh-GAPLA: αναστολή της GAPLA. Λαμβάνεται με διαίρεση της GAPLA των κυττάρων THP-G8 που υποβάλλεται σε αγωγή με χημικές ουσίες διά της GAPLA κυττάρων THP-G8 χωρίς αγωγή και αντιπροσωπεύει την κυτταροτοξικότητα των χημικών ουσιών.

Όριο ελάχιστης επαγωγής (MIT): η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία μια χημική ουσία πληροί τα κριτήρια ώστε να χαρακτηριστεί θετική.

Μείγμα: ένα μείγμα ή διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες.

Μονοσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας ένα κύριο συστατικό περιέχεται σε ποσοστό τουλάχιστον 80 % κ.β.

Πολυσυστατική ουσία: ουσία που ορίζεται από την ποσοτική της σύνθεση και της οποίας περισσότερα από ένα κύρια συστατικά περιέχονται σε συγκέντρωση ≥ 10 % κ.β. και < 80 % κ.β. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα μεταποιητικών διεργασιών. Η διαφορά μεταξύ μείγματος και πολυσυστατικής ουσίας είναι ότι το μείγμα λαμβάνεται με ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, χωρίς χημική αντίδραση. Οι πολυσυστατικές ουσίες είναι προϊόντα χημικών αντιδράσεων.

nIL8LA: η δραστηριότητα της λουσιφεράσης SLO που αντικατοπτρίζει τη δραστηριότητα του υποκινητή IL-8 (IL8LA), κανονικοποιημένη ως προς τη δραστηριότητα της λουσιφεράσης SLR που αντικατοπτρίζει τη δραστηριότητα του υποκινητή GAPDH (GAPLA). Αντιπροσωπεύει τη δραστηριότητα του υποκινητή IL-8, αφού ληφθεί υπόψη η κυτταρική βιωσιμότητα ή ο αριθμός των κυττάρων.

nSLO-LA: συντομογραφία που χρησιμοποιήθηκε στην έκθεση επικύρωσης και σε προηγούμενες δημοσιεύσεις σχετικά με τη δοκιμασία IL-8 Luc, η οποία αναφέρεται στην nIL8LA. Για τον ορισμό, βλ. nIL8LA.

Θετικός μάρτυρας: πανομοιότυπο δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με ουσία που είναι γνωστό ότι προκαλεί θετική απόκριση. Για να διασφαλίζεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης του θετικού μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της θετικής απόκρισης δεν θα πρέπει να είναι υπερβολικό.

Αβιοτικά προαπτένια: χημικές ουσίες που καθίστανται ευαισθητοποιητικές μέσω αβιοτικού μετασχηματισμού.

Μεταβολικά προαπτένια: χημικές ουσίες που χρειάζονται ενζυμική ενεργοποίηση για να εκδηλώσουν το δυναμικό δερματικής ευαισθητοποίησής τους.

Καταλληλότητα: περιγραφή της σχέσης της δοκιμής με την υπό μελέτη επίδραση και του κατά πόσον αυτή είναι αρμόζουσα και χρήσιμη για συγκεκριμένο σκοπό. Πρόκειται για τον βαθμό στον οποίο η δοκιμή μετρά ή προβλέπει σωστά τη βιολογική επίδραση υπό μελέτη. Η καταλληλότητα εμπεριέχει συνεκτίμηση της ορθότητας (συμφωνίας) της δοκιμής (16).

Αξιοπιστία: μέτρο του βαθμού στον οποίο μια δοκιμή μπορεί να αναπαράγεται διαχρονικά στο ίδιο εργαστήριο και μεταξύ εργαστηρίων, όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Εκτιμάται με υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, καθώς και της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας (16).

Σειρά δοκιμών: μια σειρά περιλαμβάνει μία ή περισσότερες υπό δοκιμή χημικές ουσίες που υποβάλλονται σε δοκιμή ταυτόχρονα με μάρτυρα με διαλύτη/φορέα και με θετικό μάρτυρα.

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, και είναι σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των δοκιμών (16).

SLO-LA: συντομογραφία που χρησιμοποιήθηκε στην έκθεση επικύρωσης και σε προηγούμενες δημοσιεύσεις σχετικά με τη δοκιμασία IL-8 Luc, η οποία αναφέρεται στην IL8LA. Για τον ορισμό, βλ. IL8LA.

SLR-LA: συντομογραφία που χρησιμοποιήθηκε στην έκθεση επικύρωσης και σε προηγούμενες δημοσιεύσεις σχετικά με τη δοκιμασία IL-8 Luc, η οποία αναφέρεται στην GAPLA. Για τον ορισμό, βλ. GAPLA.

Μάρτυρας με διαλύτη/φορέα: δείγμα που δεν υποβάλλεται σε αγωγή και περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής, εκτός της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, αλλά περιλαμβανομένου του διαλύτη/φορέα που χρησιμοποιείται. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της βασικής απόκρισης των δειγμάτων που υποβάλλονται σε αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία διαλυμένη ή σταθερώς διεσπαρμένη στον ίδιο διαλύτη/φορέα. Όταν το εν λόγω δείγμα υποβάλλεται σε δοκιμή με παράλληλο μάρτυρα θρεπτικού μέσου, καταδεικνύει επίσης αν ο διαλύτης/φορέας αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομείται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο ορθότητας των δοκιμών με τις οποίες λαμβάνονται κατηγορηματικά αποτελέσματα, και είναι σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας των δοκιμών (16).

Ουσία: ένα χημικό στοιχείο και οι ενώσεις του σε φυσική κατάσταση ή όπως λαμβάνονται με οποιαδήποτε παραγωγική διεργασία, στα οποία συμπεριλαμβάνονται όλα τα πρόσθετα που απαιτούνται για να διατηρείται η σταθερότητά του, καθώς και τυχόν προσμείξεις που

προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διεργασία, αλλά από τα οποία εξαιρούνται οι διαλύτες που είναι δυνατόν να διαχωριστούν χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα της ουσίας ούτε να μεταβληθεί η σύνθεσή της.

Επιφανειοδραστική ουσία: ονομάζεται επίσης τασιενεργή ουσία και είναι ουσία, όπως τα απορρυπαντικά, που μπορεί να μειώσει την επιφανειακή τάση ενός υγρού και, ως εκ τούτου, του επιτρέπει να σχηματίζει αφρό ή να διεισδύει σε στερεά, είναι επίσης γνωστή ως διαβρεκτικό μέσο. (TG437)

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με χρήση της παρούσας μεθόδου.

THP-G8: κυτταρική σειρά με γονίδιο αναφοράς IL-8, που χρησιμοποιείται στη δοκιμασία IL-8 Luc. Η ανθρώπινη, παρόμοια με μακροφάγα κυτταρική σειρά THP-1 διαμολύνθηκε με τα γονίδια λουσιφεράσης SLO και SLR υπό τον έλεγχο των υποκινητών IL-8 και GAPDH αντίστοιχα.

Παγκοσμίως Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) (GHS του ΟΗΕ): σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένα είδη και βαθμούς φυσικής επικινδυνότητας και επικινδυνότητας για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα στοιχεία γνωστοποίησης, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις επικινδυνότητας, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας, με τα οποία γνωστοποιούνται πληροφορίες σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (21).

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

Έγκυρη μέθοδος δοκιμών: δοκιμή που θεωρείται επαρκούς καταλληλότητας και αξιοπιστίας για συγκεκριμένο σκοπό και βασίζεται σε επιστημονικά τεκμηριωμένες αρχές. Μια δοκιμή δεν είναι ποτέ έγκυρη με την απόλυτη σημασία του όρου, αλλά μόνο σε σχέση με καθορισμένο σκοπό.

Προσάρτημα 3.2

ΑΡΧΗ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΩΝ ΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΟΠΤΙΚΟΥ ΦΙΛΤΡΟΥ ΓΙΑ ΤΑ SLO ΚΑΙ SLR

Το σύστημα δοκιμασίας πολλών γονιδίων αναφοράς, Triplus, μπορεί να χρησιμοποιηθεί με λουμινόμετρο τύπου τρυβλίων μικροτιτλοδότησης με σύστημα ανίχνευσης πολλών χρωμάτων, το οποίο μπορεί να διαθέτει οπτικό φίλτρο [π.χ. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)]. Το οπτικό φίλτρο που χρησιμοποιείται στη μέτρηση είναι υπεραπορροφώσιμο ή χαμηλοπερατό φίλτρο 600–620 nm, ή φίλτρο ζώνης διέλευσης 600–700 nm.

Μέτρηση λουσιφερασών δύο χρωμάτων με οπτικό φίλτρο.

Στο παρόν παράδειγμα χρησιμοποιείται το Phelios AB-2350 (ATTO). Το λουμινόμετρο είναι εξοπλισμένο με υπεραπορροφώσιμο φίλτρο 600 nm (R60 HOYA Co., LP 600 nm, φίλτρο 1) για τον διαχωρισμό της φωταύγειας της SLO (λμέγ. = 580 nm) και της SLR (λμέγ. = 630 nm).

Για τον προσδιορισμό των συντελεστών περατότητας πρώτα του LP 600 nm, με χρήση κεκαθαμένων ενζύμων λουσιφεράσης SLO και SLR, μετράται i) η ένταση βιοφωταύγειας των SLO και SLR χωρίς φίλτρο (F0), ii) η ένταση βιοφωταύγειας SLO και SLR που διήλθε μέσω LP 600 nm (φίλτρο 1), και iii) υπολογίζονται οι παρακάτω συντελεστές περατότητας του LP 600 nm για τις SLO και SLR.

Συντελεστές περατότητας		Συντομογραφία	Ορισμός
SLO	Συντελεστές περατότητας φίλτρου 1	κO_{R60}	Ο συντελεστής περατότητας του φίλτρου για την SLO
SLR	Συντελεστές περατότητας φίλτρου 1	κR_{R60}	Ο συντελεστής περατότητας του φίλτρου για την SLR

Όταν η ένταση των SLO και SLR σε δείγμα δοκιμής ορίζονται ως O και R, αντίστοιχα, i) η ένταση του φωτός χωρίς φίλτρο (όλο το οπτικό φάσμα) F0 και ii) η ένταση του φωτός που διέρχεται διαμέσου του LP 600 nm (φίλτρο 1) F1 περιγράφονται σύμφωνα με τους ακόλουθους τύπους.

$$F0=O+R$$

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

Οι τύποι αυτοί μπορούν να αναδιατυπωθούν ως εξής:

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

Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας τους υπολογισθέντες συντελεστές περατότητας (κO_{R60} και κR_{R60}) και των μετρηθεισών F0 και F1, μπορούν να υπολογιστούν οι τιμές των O και R ως εξής:

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

Υλικά και μέθοδοι για τον προσδιορισμό του συντελεστή περατότητας

1) Αντιδραστήρια

Μεμονωμένα κεκαθαρμένα ένζυμα λουσιφεράσης:

Λυοφιλωμένο κεκαθαρμένο ένζυμο SLO

Λυοφιλωμένο κεκαθαρμένο ένζυμο SLR

(τα οποία, για την εργασία επικύρωσης, ελήφθησαν από την GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Ιαπωνία με την κυτταρική σειρά THP-G8)

Αντιδραστήριο δοκιμασίας:

αντιδραστήριο δοκιμασίας λουσιφεράσης Tripluc® (για παράδειγμα από TOYOBO, αρ. κατ. MRA-301)

Θρεπτικό μέσο: για τη δοκιμασία λουσιφεράσης (30 ml, φυλασσόμενα σε 2 – 8°C)

Αντιδραστήριο	Συγκ.	Τελική συγκ. στο θρεπτικό μέσο	Απαιτούμενη ποσότητα
RPMI-1640	-	-	27 ml
FBS	-	10 %	3 ml

2) Παρασκευή διαλύματος ενζύμου

Διαλύετε λυοφιλωμένο κεκαθαρμένο ένζυμο λουσιφεράσης σε σωληνάριο προσθέτοντας 200 μ l Tris/HCl ή Hepes/HCl 10 ~ 100 mM (pH 7,5 ~ 8,0), συμπληρωμένο με γλυκερίνη 10 % κ.ό., και διαιρείτε το διάλυμα ενζύμου σε κλάσματα 10 μ l σε αναλώσιμα σωληνάρια 1,5 ml, τα οποία φυλάσσονται σε καταψύκτη στους -80°C. Το κατεψυγμένο διάλυμα ενζύμου μπορεί να χρησιμοποιείται μέχρι και για 6 μήνες. Κατά τη χρήση, προσθέστε 1 ml θρεπτικού μέσου για τη δοκιμασία λουσιφεράσης (RPMI-1640 με 10 % FBS) σε κάθε σωληνάριο που περιέχει τα διαλύματα ενζύμου (αραιωμένο διάλυμα ενζύμου) και τα διατηρείτε σε πάγο ώστε να μην αδρανοποιηθούν.

3) Μέτρηση της βιοφωταύγειας

Αποψύχετε αντιδραστήριο δοκιμασίας λουσιφεράσης Tripluc® (Tripluc) και το διατηρείτε σε θερμοκρασία δωματίου είτε σε υδατόλουτρο είτε σε θερμοκρασία αέρα

περιβάλλοντος. Θέστε σε λειτουργία το λουμινόμετρο 30 λεπτά προτού ξεκινήσετε τη μέτρηση ώστε να σταθεροποιηθεί ο φωτοπολλαπλασιαστής. Μεταφέρετε 100 μl του αραιωμένου διαλύματος ενζύμου σε μαύρο τρυβλίο 96 κοιλοτήτων (επίπεδης βάσης) (το δείγμα αναφοράς SLO στις #B1, #B2, #B3, και το δείγμα αναφοράς της SLR στις #D1, #D2, #D3). Στη συνέχεια, μεταφέρετε 100 μl προθερμασμένου Tripluc σε κάθε κοιλότητα του τρυβλίου που περιέχει το αραιωμένο διάλυμα ενζύμου με χρήση πολυκάναλης πιπέτας. Ανακινήστε το τρυβλίο επί 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 25°C) χρησιμοποιώντας αναδευτήρα τρυβλίων. Αφαιρέστε τις φυσαλίδες από τα διαλύματα σε κοιλότητες, εάν εμφανιστούν. Τοποθετήστε το τρυβλίο στο λουμινόμετρο για να μετρήσετε τη δράση της λουσιφεράσης. Μετράται η βιοφωταύγεια επί 3 δευτερόλεπτα, τόσο απουσία (F0) όσο και παρουσία (F1) του οπτικού φίλτρου.

Ο συντελεστής περατότητας του οπτικού φίλτρου υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{συντελεστής περατότητας (SLO (κO}_{R60})) = (\#B1 \text{ του F1} + \#B2 \text{ του F1} + \#B3 \text{ του F1}) / (\#B1 \text{ του F0} + \#B2 \text{ του F0} + \#B3 \text{ του F0})$$

$$\text{συντελεστής περατότητας (SLR (κR}_{R60})) = (\#D1 \text{ του F1} + \#D2 \text{ του F1} + \#D3 \text{ του F1}) / (\#D1 \text{ του F0} + \#D2 \text{ του F0} + \#D3 \text{ του F0})$$

Οι υπολογισθέντες συντελεστές περατότητας χρησιμοποιούνται για όλες τις μετρήσεις που πραγματοποιούνται με χρήση του ίδιου λουμινόμετρου.

Ποιοτικός έλεγχος του εξοπλισμού

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι διαδικασίες που περιγράφονται στο πρωτόκολλο IL-8 Luc (18).

Προσάρτημα 3.3

ΟΥΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

Πριν εντάξουν στην καθημερινή πρακτική τη δοκιμή που περιγράφεται στο παρόν προσάρτημα της μεθόδου δοκιμών B.71, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν την τεχνική τους ικανότητα επιτυγχάνοντας την αναμενόμενη πρόβλεψη βάσει της δοκιμασίας IL-8 Luc για τις 10 ουσίες στον πίνακα 1, καθώς και τιμές εντός του αντίστοιχου εύρους τιμών αναφοράς για 8 τουλάχιστον από τις 10 ουσίες ελέγχου ικανότητας (που έχουν επιλεγεί έτσι ώστε να αντιπροσωπεύουν το φάσμα αποκρίσεων για τις πηγές κινδύνου ευαισθητοποίησης του δέρματος). Άλλα κριτήρια επιλογής ήταν ότι οι ουσίες θα πρέπει να είναι διαθέσιμες στο εμπόριο και ότι θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα *in vivo* δεδομένα αναφοράς υψηλής ποιότητας καθώς και *in vitro* δεδομένα υψηλής ποιότητας που προκύπτουν με τη δοκιμασία IL-8 Luc. Επίσης, για τη δοκιμασία IL-8 Luc υπάρχουν διαθέσιμα δημοσιευμένα δεδομένα αναφοράς (6) (1).

Πίνακας 1: Συνιστώμενες ουσίες για την απόδειξη τεχνικής ικανότητας όσον αφορά τη δοκιμασία IL-8 Luc

Ο υ σ ί ε ς ε λ έ γ χ ο υ ι κ α ν ό τ η τ α ς	Α ι α λ υ τ ό τ η τ α Κ α τ ά σ τ α ς η	Π ρό βλ εψ η Π ρ ό β λ ε ψ η I V O 1 5 σ τ α	Εύρος αναφοράς (μg/ml) ³
Αριθ. CAS			

2,
4
-
Δ
ιν
ιτ
ρ
ο
χ
λ
ω
ρ
ο
β
ε
ν
ζ
ό
λι
ο

Ε
υ
α
ι
σ
θ
η
τ
ο
π
ο
ι
η
τ
ι
κ
ό
(
ε
ξ
α
ι
ρ
ε
τ
ι
κ
ά
ι
σ
χ
υ
ρ
ό

Μ
η
δ
ι
α
λ
υ
τ
ή

Σ
τ
ε
ρ
ε
ό

Θε
τικ
ή

Φ
ο
ρ
μ
α
λ
δ
ε
ϋ
δ
η

50-00-0

Ε
υ
α
ι
σ
θ
η
τ
ο
π
ο
ι
η
τ
ι

Δ
ι
α
λ
υ
τ
ή

Υ
γ
ρ
ό

Θε
τικ
ή

2
-
Μ
ε
ρ
κ
α
π
τ
ο
β
ε
ν
ζ
ο
θ
ει
α
ζ
ό
λι
ο

A
ιθ
υ
λ
ε
ν
ο
δι
α
μ
ίν
η

	κ ό (ι σ χ υ ρ ό	
	E υ α ι σ θ η τ ο π ο ι	
M	η η τ ι κ ό (μ ε τ ρ ί ω ς ι σ χ υ ρ ό	
Σ	δ ι α λ υ τ ή	Θε τικ ή
τ ε ρ ε ό		
	E υ α ι σ θ η τ ο π ο ι	
Δ	ι α λ υ τ ή	Θε τικ ή
Υ γ ρ ό		

τ
ι
κ
ό
(
μ
ε
τ
ρ
ί
ω
ς
ι
σ
χ
υ
ρ
ό

Δ
ι
μ
ε
θ
α
κ
ρ
υ
λι
κ
ό
ς
ε
σ
τ
έ
ρ
α
ς
τ
η
ς
αι
θ
υ
λ
ε
ν
ο
γ
λ
υ
κ
ό

	M	Ευ	
	η	αισ	Θ
	δ	θητ	ε
Υ	ι	οπο	τ
γ	α	ητι	ι
ρ	λ	κό	κ
ό	υ	(ας	ή
	τ	θεν	
	ή	ές)	

λ
η
ς

4
-
Α
λ
λ
υ
λ
α
νι
σ
ό
λ
η
(ε
σ
τ
ρ
α
γ
κ
ό
λ
η

Θ
ει
ικ
ή
σ
τ
ρ
ε
π
τ
ο
μ
υ
κί
ν
η

Γ
λ
υ
κ
ε
ρί

			E	
			υ	
			α	
			ι	
			σ	
			θ	
			η	
			τ	
	M		ο	
	η		π	
			ο	
Y	δ		ι	Θε
γ	ι		η	τικ
ρ	α		τ	ή
ό	λ		ι	
	υ		κ	
	τ		ό	
	ή		(	
			α	
			σ	
			θ	
			ε	
			ν	
			έ	
			ς	
		M		
		η		
		ε		
		υ		
		α		
		ι		
Σ	Δ		σ	
τ	ι		θ	
ε	α		η	Αρ
ρ	λ		τ	νη
ε	υ		ο	τικ
ό	τ	ή	ο	ή
			ι	
			η	
			τ	
			ι	
			κ	
			ό	
		M		
Y	Δ		η	Αρ
γ	ι		ε	νη
ρ	α		υ	τικ
ό	λ		α	ή
	υ			
	τ		ι	

ν
η

ή σ
θ
η
τ
ο
π
ο
ι
η
τ
ι
κ
ό
Μ
η
ε
υ
α
ι
σ
θ
η
τ
ο
π
ο
ι
η
τ
ι
κ
ό

Ι
σ
ο
π
ρ
ο
π
α
ν
ό
λ
η

Δ
ι
α
λ
υ
τ
ή
Υ
γ
ρ
ό
Αρ
νη
τικ
ή

Συντομογραφίες: Αριθ. CAS = Αριθμός μητρώου της υπηρεσίας Chemical Abstract Service

¹ Η ισχύς *in vivo* συνάγεται με την εφαρμογή των κριτηρίων που έχει προτείνει το ECETOC (19).

² Βάσει των ιστορικών τιμών που παρατηρήθηκαν (1) (6).

³ Τα CV05 και IL-8 Luc MIT υπολογίστηκαν βάσει της υδατοδιαλυτότητας που προέκυψε από το EPI Suite™.

⁴ CV05: η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία οι χημικές ουσίες εμφανίζουν Inh-GAPLA κάτω του 0,05.

⁵ MIT: οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις στις οποίες μια χημική ουσία πληροί τα κριτήρια ώστε να χαρακτηριστεί θετική.

Προσάρτημα 3.4

ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΙ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΚΡΙΣΗΣ

nIL8LA (nSLO-LA)

Μετράται η j-οστή επανάληψη ($j = 1-4$) της i-οστής συγκέντρωσης ($i = 0-11$) για τις IL8LA (SLO-LA) και GAPLA (SLR-LA) αντίστοιχα. Η κανονικοποιημένη IL8LA, καλούμενη ως nIL8LA (nSLO-LA), ορίζεται ως εξής:

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

Αυτή είναι η βασική μονάδα μέτρησης στην παρούσα δοκιμασία.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Το κύριο μέτρο στην παρούσα δοκιμασία είναι η πολλαπλάσια αύξηση της μέσης nIL8LA (nSLO-LA) για την επανάληψη στην i-οστή συγκέντρωση σε σύγκριση με την αντίστοιχη στη συγκέντρωση 0, Ind-IL8LA. Αυτή η αναλογία αποτυπώνεται με τον ακόλουθο τύπο:

$$Ind - IL8LA_i = \{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j}\}$$

Το κύριο εργαστήριο πρότεινε σε θετικό αποτέλεσμα για την υπό δοκιμή χημική ουσία να αντιστοιχεί τιμή 1,4. Η εν λόγω τιμή προέκυψε βάσει έρευνας στα ιστορικά δεδομένα του κύριου εργαστηρίου. Στη συνέχεια, η ομάδα διαχείρισης δεδομένων χρησιμοποίησε την εν λόγω τιμή σε όλες τις φάσεις της μελέτης επικύρωσης. Το κύριο αποτέλεσμα, η Ind-IL8LA, είναι ο λόγος 2 αριθμητικών μέσων όρων, όπως εμφανίζεται στην εξίσωση.

Διάστημα εμπιστοσύνης 95 % (95 % CI)

Για να καταδειχθεί η ακρίβεια αυτού του μέτρου κύριου αποτελέσματος, μπορεί να εκτιμηθεί το διάστημα εμπιστοσύνης 95 % (95 % CI) με βάση τον λόγο. Το κατώτερο όριο του 95 % CI ≥ 1 υποδεικνύει ότι η nIL8LA με την i-οστή συγκέντρωση είναι σημαντικά υψηλότερη από την αντίστοιχη με τον μάρτυρα με διαλύτη. Το 95 % CI μπορεί να εκτιμηθεί με διάφορους τρόπους. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο που είναι γνωστή ως θεώρημα του Fieller. Το διάστημα εμπιστοσύνης 95 % βάσει του θεωρήματος λαμβάνεται σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

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

Όπου

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0,975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}, \quad B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}, \quad C = \bar{y}_i^2 - t_{0,975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ και } n_0 = 4,$$

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

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

$t_{0,975(v)}$ είναι το εκατοστημόριο 97,5 της κεντρικής κατανομής t με τον βαθμό ελευθερίας v , όπου

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

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Η Inh-GAPLA είναι ο λόγος της μέσης GAPLA (SLR-LA) για την επανάληψη της i -οστής συγκέντρωσης σε σύγκριση με την αντίστοιχη για τον μάρτυρα με διαλύτη, και αποτυπώνεται με την ακόλουθη εξίσωση

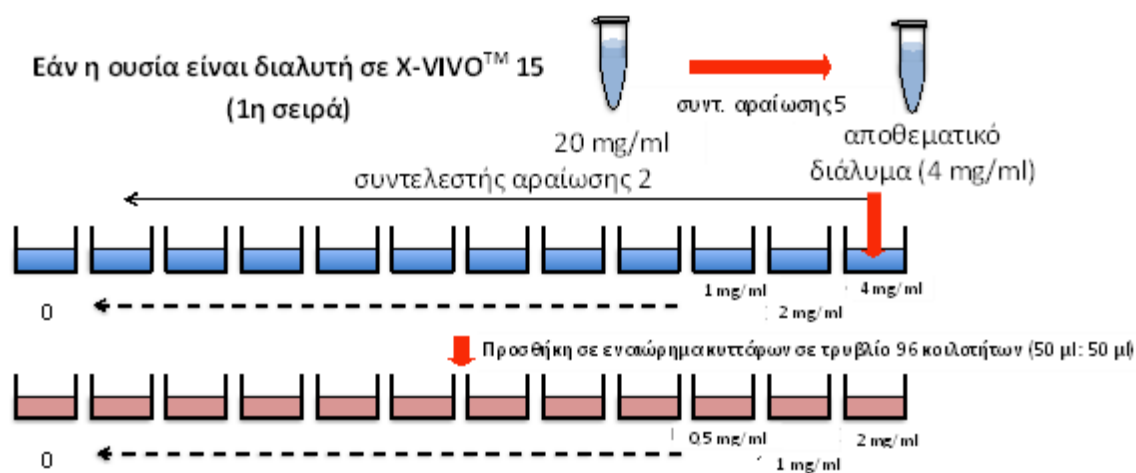
$$Inh - GAPLA_i = \{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \} / \{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \}.$$

Δεδομένου ότι GAPLA είναι ο παρονομαστής της $nIL8LA$, μια εξαιρετικά μικρή τιμή προκαλεί μεγάλη μεταβολή της $nIL8LA$. Ως εκ τούτου, οι τιμές $Ind-IL8LA$ με εξαιρετικά μικρή τιμή Inh-GAPLA (κάτω από 0,05) μπορεί να θεωρηθούν ότι αντιπροσωπεύουν ανεπαρκή βαθμό ακρίβειας.

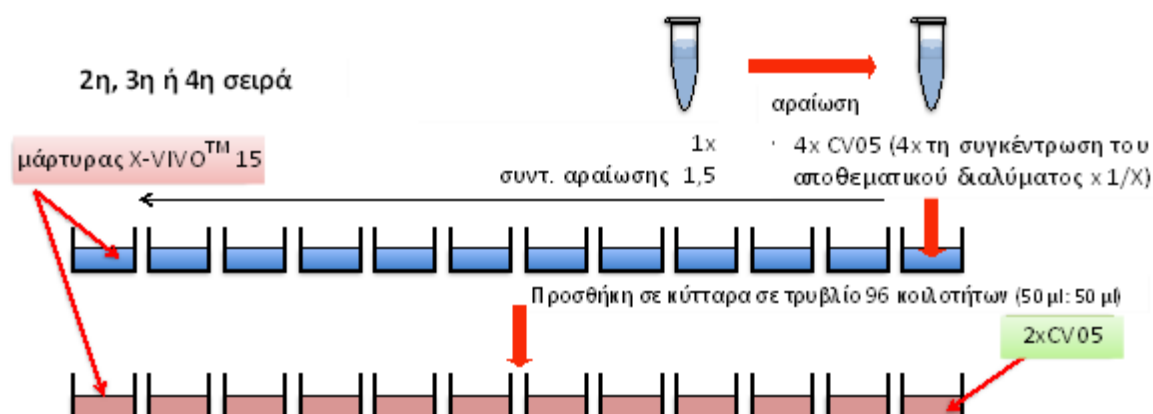
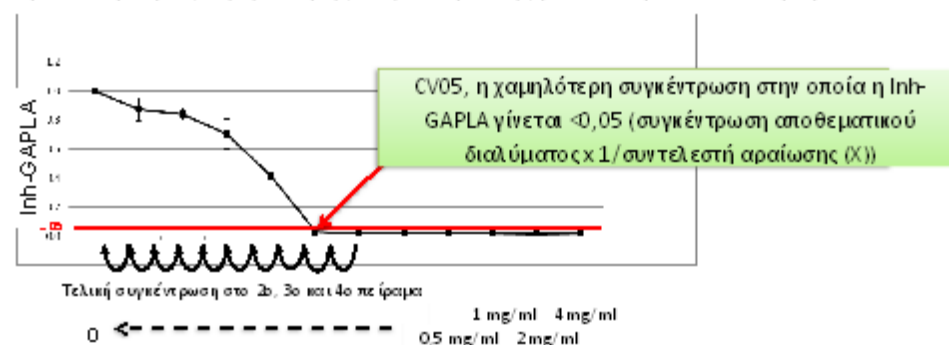
Προσάρτημα 3.5

ΤΟ ΣΧΗΜΑ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΛΥΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ IL-8 LUC.

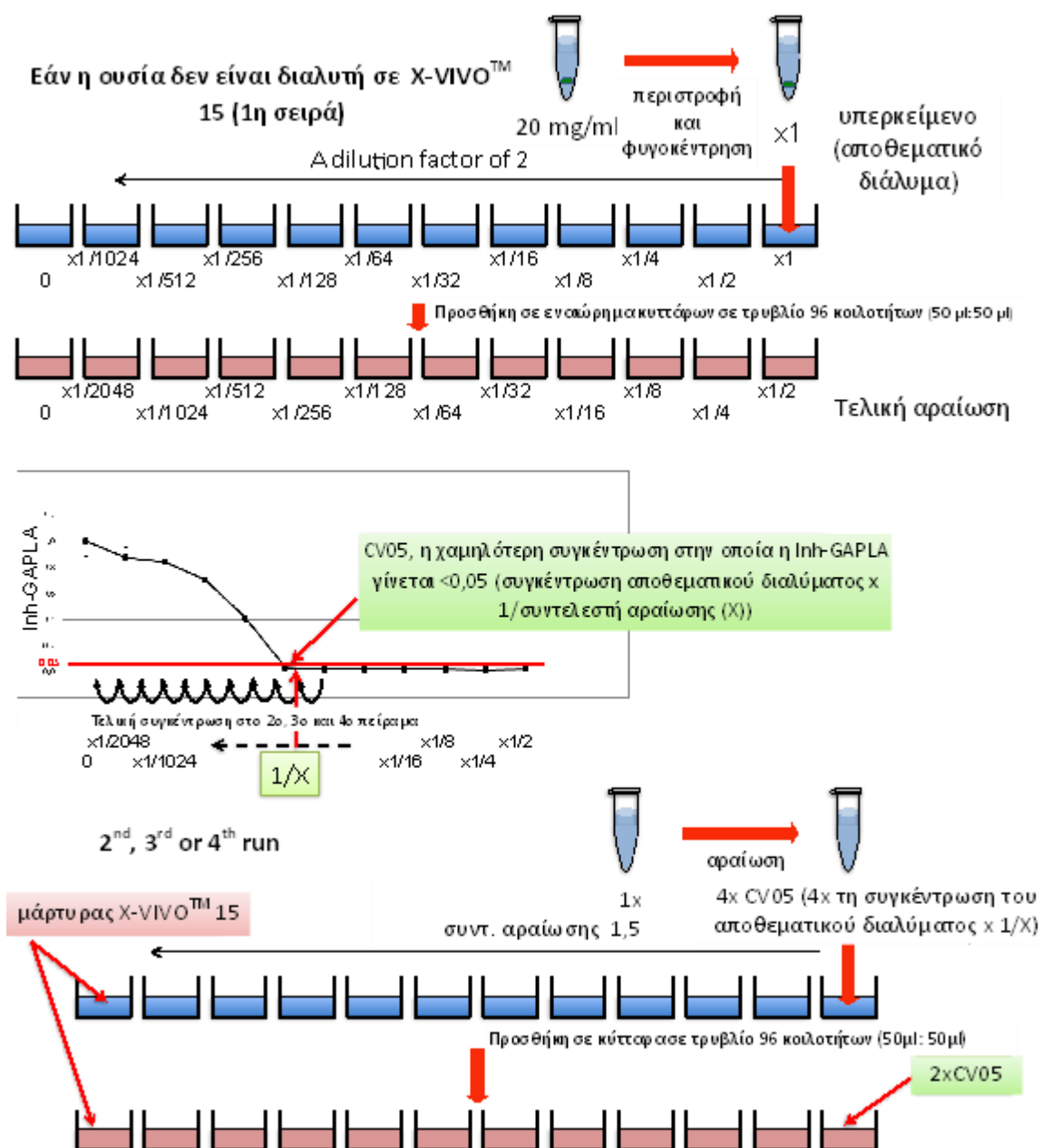
α) Για χημικές ουσίες που διαλύονται σε X-VIVO™ 15 στα 20 mg/ml



Προσδιορισμός υψηλότερης συγκέντρωσης με τα παρακάτω πειράματα



β) Για χημικές ουσίες που δεν διαλύονται σε X-VIVO™ 15 στα 20 mg/ml



Προσάρτημα 3.6

**ΤΟ ΣΧΗΜΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΛΥΣΗ 4-NBB ΓΙΑ ΤΟΝ ΘΕΤΙΚΟ ΜΑΡΤΥΡΑ
ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ IL-8 LUC.**

9) Στο μέρος Γ προστίθενται τα ακόλουθα κεφάλαια:

«Γ.52 ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΗ ΔΟΚΙΜΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΑΣ ΓΕΝΕΑΣ ΣΤΟ ΡΥΖΟΨΑΡΟ (MEOGRT)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 240 του ΟΟΣΑ (2015). Στην εκτεταμένη δοκιμή στην αναπαραγωγή μίας γενεάς στο ρυζόψαρο (MEOGRT) περιγράφεται μια ολοκληρωμένη μέθοδος δοκιμών που βασίζεται στην έκθεση πολλών γενεών με σκοπό τη συλλογή δεδομένων σχετικά με την επικινδυνότητα για το περιβάλλον και την αξιολόγηση του κινδύνου των χημικών ουσιών, περιλαμβανομένων των χημικών ουσιών για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες ότι αποτελούν ενδοκρινικούς διαταράκτες (EDC). Στο πλαίσιο της MEOGRT, η έκθεση συνεχίζεται μέχρι την εκκόλαψη (έως δύο εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση) στη δεύτερη (F2) γενεά. Για να αιτιολογηθεί η σκοπιμότητα της παράτασης της γενεάς F2 πέραν της εκκόλαψης, θα χρειαστούν περαιτέρω διερευνήσεις· επί του παρόντος, δεν υπάρχουν επαρκείς διαθέσιμες πληροφορίες αναφορικά με τις σχετικές συνθήκες ή τα κριτήρια που δικαιολογούν την παράταση της F2. Ωστόσο, η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί να επικαιροποιηθεί βάσει νέων στοιχείων και δεδομένων. Για παράδειγμα, η καθοδήγηση σχετικά με την παράταση της γενεάς F2 μέσω αναπαραγωγής μπορεί να είναι χρήσιμη υπό ορισμένες συνθήκες (π.χ. χημικές ουσίες με υψηλό δυναμικό βιοσυγκέντρωσης ή ενδείξεις διαγενεακών επιδράσεων σε άλλες ταξινομικές ομάδες). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση των δυνητικών χρόνιων επιδράσεων χημικών ουσιών, περιλαμβανομένων των χημικών ουσιών που είναι ενδοκρινικοί διαταράκτες, στα ψάρια. Στο πλαίσιο της μεθόδου δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στις δυνητικές επιδράσεις που αφορούν τον πληθυσμό (δυσμενείς επιδράσεις στην επιβίωση, την ανάπτυξη, τη σωματική αύξηση και την αναπαραγωγή) με σκοπό τον υπολογισμό μιας συγκέντρωσης μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) ή μιας αποτελεσματικής συγκέντρωσης (ECx), αν και πρέπει να επισημανθεί ότι οι προσεγγίσεις ECx σπάνια είναι κατάλληλες για μεγάλες μελέτες αυτού του τύπου στο πλαίσιο των οποίων η αύξηση του αριθμού των συγκεντρώσεων δοκιμής για να καταστεί εφικτός ο προσδιορισμός της επιθυμητής ECx μπορεί να είναι πρακτικά δυσχερής, γεγονός που ενδέχεται επίσης να εγείρει σημαντικές ανησυχίες σχετικά με την καλή μεταχείριση των ζώων λόγω του μεγάλου αριθμού των χρησιμοποιούμενων ζώων. Για χημικές ουσίες που δεν επιβάλλεται να αξιολογηθούν σε «πολλές γενεές» ή χημικές ουσίες που δεν είναι δυνητικοί ενδοκρινικοί διαταράκτες, ενδέχεται να υπάρχουν άλλες καταλληλότερες μέθοδοι δοκιμών (1). Το ιαπωνικό ρυζόψαρο είναι το κατάλληλο είδος για χρήση στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, λόγω του σύντομου κύκλου ζωής του και της δυνατότητας προσδιορισμού του γενετικού φύλου του (2), στοιχείο κρίσιμης σημασίας στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Οι συγκεκριμένες μέθοδοι και παράμετροι

παρατήρησης που περιγράφονται αναλυτικά στην παρούσα μέθοδο αφορούν μόνο το ιαπωνικό ρυζόψαρο. Για άλλα μικρά είδη ψαριών (π.χ. το ζεβρόψαρο), μπορούν να προσαρμοστούν παρεμφερή πρωτόκολλα δοκιμής.

2. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών μετρώνται διάφορες βιολογικές παράμετροι. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στις δυνητικές επιδράσεις σε σχετικές με τον πληθυσμό παραμέτρους, περιλαμβανομένης της επιβίωσης, της αδρής ανάπτυξης, της σωματικής αύξησης και της αναπαραγωγής. Δευτερευόντως, προκειμένου να συλλεχθούν στοιχεία σχετικά με τον μηχανισμό δράσης αλλά και να καταστεί εφικτή η συσχέτιση με αποτελέσματα από άλλα είδη επιτόπιων και εργαστηριακών μελετών, όταν υπάρχουν εκ των υστέρων στοιχεία που δείχνουν ότι κάποια χημική ουσία δρα ως ενδοκρινικός διαταράκτης (π.χ. ανδρογόνος ή οιστρογόνος δράση σε άλλες δοκιμές και δοκιμασίες), τότε συλλέγονται άλλες χρήσιμες πληροφορίες μέσω μέτρησης του mRNA της λεκιθογενίνης (*vtg*) (ή της πρωτεΐνης της λεκιθογενίνης, VTG), μέσω των φαινοτυπικών δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου (SSC) που σχετίζονται με το γενετικό φύλο, και μέσω αξιολόγησης της ιστοπαθολογικής εικόνας. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι, εάν για μια υπό δοκιμή χημική ουσία ή τους μεταβολίτες της δεν υπάρχουν υπόνοιες ότι είναι ενδοκρινικοί διαταράκτες, μπορεί να μην είναι απαραίτητη η μέτρηση των εν λόγω δευτερευόντων παραμέτρων και να είναι σκόπιμο να διεξάγονται μελέτες με λιγότερες απαιτήσεις από άποψη πόρων και ζώων (1). Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

3. Λόγω του περιορισμένου αριθμού των χημικών ουσιών που υποβάλλονται σε δοκιμές και των εργαστηρίων που συμμετέχουν στη διαδικασία επικύρωσης αυτής της μάλλον πολύπλοκης δοκιμασίας, αναμένεται ότι όταν θα καταστεί διαθέσιμος επαρκής αριθμός μελετών για την εξακρίβωση του αντικτύπου αυτού του νέου σχεδιασμού μελετών, η μέθοδος δοκιμών θα επανεξεταστεί και, εφόσον απαιτείται, θα αναθεωρηθεί υπό το πρίσμα της αποκτηθείσας εμπειρίας. Τα δεδομένα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο επίπεδο 5 του εννοιολογικού πλαισίου του ΟΟΣΑ για τον έλεγχο και την αξιολόγηση ενδοκρινικών διαταρακτών (3). Η μέθοδος δοκιμών ξεκινά με έκθεση ενήλικων ψαριών (η γενεά F0) στην υπό δοκιμή χημική ουσία κατά τη φάση της αναπαραγωγής. Η έκθεση συνεχίζεται κατά τη φάση της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής της γενεάς F1 και κατά τη φάση της εκκόλαψης της γενεάς F2· ως εκ τούτου, η δοκιμασία επιτρέπει την αξιολόγηση τόσο των δομικών ενδοκρινικών οδών όσο και των οδών ενδοκρινικής ενεργοποίησης. Για την ερμηνεία των σχετικών με το ενδοκρινικό σύστημα παραμέτρων, μπορεί να εφαρμόζεται προσέγγιση βάρους της απόδειξης.

4. Η δοκιμή θα πρέπει να περιλαμβάνει επαρκή αριθμό ατόμων ώστε να διασφαλίζεται επαρκής ικανότητα αξιολόγησης των σχετικών με την αναπαραγωγή παραμέτρων (βλ. προσάρτημα 3) αλλά ταυτόχρονα να χρησιμοποιείται ο ελάχιστος απαιτούμενος αριθμός ζώων, για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων. Δεδομένων των μεγάλων αριθμών χρησιμοποιούμενων ζώων, είναι σημαντικό να αξιολογείται ενδελεχώς η ανάγκη διεξαγωγής της δοκιμής σε σχέση με τα υπάρχοντα δεδομένα, τα οποία ενδέχεται να περιλαμβάνουν ήδη συναφείς πληροφορίες σχετικά με πολλές από τις παραμέτρους που εξετάζονται με τη MEOGRT. Ως προς αυτό το θέμα, μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμο το πλαίσιο δοκιμών τοξικότητας στα ψάρια (Fish Toxicity Testing Framework) του ΟΟΣΑ (1).
5. Η μέθοδος δοκιμών έχει σχεδιαστεί πρωτίστως με σκοπό τη διάκριση των επιδράσεων μιας μεμονωμένης ουσίας. Ωστόσο, εάν απαιτείται η διεξαγωγή δοκιμής σε μείγμα, θα πρέπει να εξετάζεται κατά πόσον η δοκιμή θα δώσει αποδεκτά αποτελέσματα για τον επιδιωκόμενο κανονιστικό σκοπό.
6. Πριν από την έναρξη της δοκιμής, είναι σημαντικό να υπάρχουν πληροφορίες για τις φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ιδίως προκειμένου να παρασκευάζονται σταθερά διαλύματα. Επίσης, είναι απαραίτητη η ύπαρξη αναλυτικής μεθόδου επαρκούς ευαισθησίας για την επαλήθευση των συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Η δοκιμή ξεκινά με την έκθεση σεξουαλικά ώριμων αρσενικών και θηλυκών (τουλάχιστον 12 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση) σε ζεύγη αναπαραγωγής επί 3 εβδομάδες, στη διάρκεια των οποίων η υπό δοκιμή χημική ουσία κατανέμεται στον οργανισμό της γονικής γενεάς (F0) ανάλογα με την τοξικοκινητική συμπεριφορά της. Όσο το δυνατόν πιο κοντά στην πρώτη ημέρα της τέταρτης εβδομάδας, τα αυγά συλλέγονται για να ξεκινήσει η γενεά F1. Κατά τη φάση της εκτροφής της γενεάς F1 (διάρκειας 15 εβδομάδων συνολικά), αξιολογείται η εκκολαψιμότητα και η επιβίωση. Επιπλέον, πραγματοποιείται δειγματοληψία ψαριών στις 9-10 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση με σκοπό την ανάλυση αναπτυξιακών παραμέτρων και αξιολογείται η ωοτοκία επί τρεις εβδομάδες, από τη 12η μέχρι τη 14η εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση. Μετά την τρίτη εβδομάδα αξιολόγησης της αναπαραγωγής δημιουργείται γενεά F2, η οποία και εκτρέφεται μέχρι την ολοκλήρωση της εκκόλαψης.

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

8. Ακολούθως παρατίθενται τα κριτήρια που εφαρμόζονται όσον αφορά την εγκυρότητα της δοκιμής:

- η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου θα πρέπει να είναι ≥ 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής,
- η μέση θερμοκρασία του νερού σε όλη τη διάρκεια της μελέτης θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 24 και 26°C. Τυχόν σύντομες αποκλίσεις από τον μέσο όρο σε μεμονωμένα ενυδρεία δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τους 2°C,
- η μέση γεννητικότητα των μαρτύρων σε καθεμία από τις γενεές (F0 και F1) θα πρέπει να υπερβαίνει τα 20 αυγά ανά ζεύγος ανά ημέρα. Η γονιμότητα του συνόλου των αυγών που παράγονται στη διάρκεια της αξιολόγησης θα πρέπει να υπερβαίνει το 80 %. Επιπλέον, 16 από τα συνιστώμενα 24 ζεύγη αναπαραγωγής μάρτυρες (> 65 %) θα πρέπει να παράγουν πάνω από 20 αυγά ανά ζεύγος ανά ημέρα,
- η εκκολαπιμότητα των αυγών θα πρέπει να είναι ≥ 80 % (κατά μέσο όρο) στους μάρτυρες (σε καθεμία από τις γενεές F1 και F2),
- η επιβίωση μετά την εκκόλαψη μέχρι την 3η εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση και από την 3η εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση μέχρι τη λήξη της δοκιμής για τη γενεά F1 (δηλ. τη 15η εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση) θα πρέπει να είναι ≥ 80 % (κατά μέσο όρο) και να είναι ≥ 90 % (κατά μέσο όρο) αντίστοιχα στους μάρτυρες (F1),
- θα πρέπει να υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα διατηρήθηκαν ικανοποιητικά στα όρια του $\pm 20\%$ του μέσου όρου των τιμών που μετρήθηκαν.

Όσον αφορά τη θερμοκρασία του νερού, παρότι δεν αποτελεί κριτήριο εγκυρότητας, τα πανομοιότυπα δείγματα εντός μιας ορισμένης αγωγής δεν θα πρέπει να παρουσιάζουν στατιστικές αποκλίσεις μεταξύ τους, και οι ομάδες αγωγής στο πλαίσιο της δοκιμής δεν θα πρέπει να παρουσιάζουν στατιστικές αποκλίσεις μεταξύ τους (με βάση τις καθημερινές μετρήσεις της θερμοκρασίας, και χωρίς να λαμβάνονται υπόψη οι σύντομες αποκλίσεις).

9. Παρότι μπορεί να παρατηρηθεί μείωση της αναπαραγωγής στις ομάδες υψηλότερης έκθεσης, η αναπαραγωγή τουλάχιστον στην ομάδα με την τρίτη υψηλότερη έκθεση και σε όλες τις ομάδες χαμηλής έκθεσης της F0 θα πρέπει να επαρκεί για την πλήρωση των επωαστήρων εκκόλαψης. Επιπλέον, η επιβίωση των εμβρύων στην ομάδα με την τρίτη υψηλότερη έκθεση και στις ομάδες χαμηλής έκθεσης στην F1 θα πρέπει να επαρκεί για την αξιολόγηση των παραμέτρων κατά τη δειγματοληψία ατόμων πριν την ενηλικίωση (βλ. παραγράφους 36 και 38 και προσάρτημα 9). Επίσης, θα πρέπει να επιτυγχάνεται τουλάχιστον το ελάχιστο ποσοστό επιβίωσης μετά την εκκόλαψη ($\sim 20\%$) στην ομάδα της

F1 με τη δεύτερη υψηλότερη έκθεση. Τα παραπάνω δεν αποτελούν κριτήρια εγκυρότητας καθαυτά αλλά συστάσεις που βοηθούν στον υπολογισμό αξιόπιστων NOEC.

10. Εάν παρατηρηθεί απόκλιση από τα κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής, οι συνέπειες θα πρέπει να εκτιμώνται σε σχέση με την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της δοκιμής και οι εν λόγω αποκλίσεις και εκτιμήσεις θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στην έκθεση δοκιμής.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εργαστηριακός εξοπλισμός

11. Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και, ειδικότερα, τα ακόλουθα:

- α) οξυγονόμετρα και pHμετρα,
- β) εξοπλισμός για τον προσδιορισμό της σκληρότητας και αλκαλικότητας του νερού,
- γ) κατάλληλη συσκευή για τον έλεγχο της θερμοκρασίας με δυνατότητα συνεχούς, κατά προτίμηση, παρακολούθησης,
- δ) δεξαμενές κατασκευασμένες από χημικώς αδρανές υλικό και κατάλληλης χωρητικότητας ανάλογα με τον συνιστώμενο πληθυσμιακό φόρτο και την πληθυσμιακή πυκνότητα (βλ. προσάρτημα 3),
- ε) ζυγός κατάλληλης ακρίβειας (δηλαδή ακρίβεια έως $\pm 0,5$ mg).

Νερό

12. Ως νερό δοκιμής μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε νερό στο οποίο το υπό δοκιμή είδος εμφανίζει την ενδεδειγμένη μακροπρόθεσμη επιβίωση και σωματική αύξηση. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής το νερό θα πρέπει να είναι σταθερής ποιότητας. Για να είναι βέβαιο ότι το νερό αραίωσης δεν θα επηρεάσει δυσμενώς το αποτέλεσμα της δοκιμής (π.χ. σχηματίζοντας σύμπλοκα με την υπό δοκιμή χημική ουσία) ούτε τις επιδόσεις των γεννητόρων, θα πρέπει κατά διαστήματα να λαμβάνονται δείγματα για ανάλυση. Όταν είναι γνωστό ότι η ποιότητα του νερού αραίωσης είναι σχετικά σταθερή, θα πρέπει, π.χ. κάθε έξι μήνες, να γίνονται μετρήσεις βαρέων μετάλλων (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), σημαντικών ανιόντων και κατιόντων (π.χ. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), φυτοφαρμάκων, ολικού οργανικού άνθρακα και αιωρούμενων στερεών. Μερικά χημικά χαρακτηριστικά αποδεκτού νερού αραίωσης απαριθμούνται στο προσάρτημα 2. Το pH του νερού θα πρέπει να είναι της τάξεως του 6,5 έως 8,5, κατά τη διάρκεια όμως μιας δεδομένης δοκιμής δεν θα πρέπει να αποκλίνει πέραν των $\pm 0,5$ μονάδων pH.

Σύστημα έκθεσης

13. Ο σχεδιασμός και τα υλικά που χρησιμοποιούνται για το σύστημα έκθεσης δεν προσδιορίζονται. Για την κατασκευή του συστήματος δοκιμής θα πρέπει να χρησιμοποιείται γυαλί, ανοξείδωτος χάλυβας ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό, το οποίο δεν έχει μολυνθεί στη διάρκεια προηγούμενων δοκιμών. Για τους σκοπούς της δοκιμής, ένα κατάλληλο σύστημα έκθεσης μπορεί να αποτελείται από ένα σύστημα συνεχούς ροής (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13).

Διαλύματα δοκιμής

14. Το αποθεματικό διάλυμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να διοχετεύεται στο σύστημα έκθεσης μέσω κατάλληλης αντλίας. Ο ρυθμός ροής του αποθεματικού διαλύματος θα πρέπει να βαθμονομείται σύμφωνα με την ανάλυση επιβεβαίωσης για τα διαλύματα της δοκιμής πριν από την έναρξη της έκθεσης, και να ελέγχεται ογκομετρικά κατά διαστήματα στη διάρκεια της δοκιμής. Το διάλυμα της δοκιμής σε κάθε θάλαμο ανανεώνεται επαρκώς (π.χ. τουλάχιστον 5 ανανεώσεις του όγκου/ημέρα έως 16 ανανεώσεις του όγκου/ημέρα ή ροή έως 20 ml/λεπτό), ανάλογα με τη σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και την ποιότητα του νερού.
15. Τα διαλύματα δοκιμής με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις παρασκευάζονται συνήθως με αραίωση αποθεματικού διαλύματος. Το αποθεματικό διάλυμα θα πρέπει κατά προτίμηση να παρασκευάζεται με απλή ανάμειξη ή ανακίνηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο νερό αραίωσης με μηχανικά μέσα (π.χ. ανάδευση και/ή υπερήχους). Για να επιτευχθεί κατάλληλα πυκνό αποθεματικό διάλυμα, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν στήλες/συστήματα κορεσμού ή παθητικές δοσιμετρικές μέθοδοι (14). Θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε προσπάθεια ώστε να αποφεύγεται η χρήση διαλυτών ή φορέων, για τους ακόλουθους λόγους: 1) ορισμένοι διαλύτες ενδέχεται να συνεπάγονται οι ίδιοι τοξικότητα και/ή ανεπιθύμητες ή απρόβλεπτες αποκρίσεις, 2) η διεξαγωγή δοκιμών με χημικές ουσίες σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από την υδατοδιαλυτότητά τους (όπως συμβαίνει συχνά όταν χρησιμοποιούνται διαλύτες) μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα ανακριβείς προσδιορισμούς των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων, (3) η χρήση διαλυτών σε μακροπρόθεσμες δοκιμές μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τον σημαντικό σχηματισμό βιοϋμένων, ο οποίος σχετίζεται με μικροβιακή δραστηριότητα που μπορεί να επηρεάσει τις περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς και την ικανότητα διατήρησης των συγκεντρώσεων έκθεσης, και (4) ελλείπει ιστορικών δεδομένων που να καταδεικνύουν ότι ο διαλύτης δεν επηρεάζει την έκβαση της μελέτης, η χρήση διαλυτών απαιτεί αγωγή μάρτυρα με διαλύτη η οποία έχει επιπτώσεις στην καλή μεταχείριση των ζώων, δεδομένου ότι απαιτείται πρόσθετος αριθμός ζώων για τη διεξαγωγή της δοκιμής. Για χημικές ουσίες που παρουσιάζουν δυσκολίες στη δοκιμή, μπορεί να χρησιμοποιείται διαλύτης ως έσχατη λύση· συμβουλευτείτε το έγγραφο κατευθυντήριων γραμμών του ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές υδατικής τοξικότητας δύσκολων ουσιών και μειγμάτων (OECD Guidance Document 23 on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures) (15) για

την επιλογή της βέλτιστης μεθόδου. Η επιλογή του διαλύτη θα καθορίζεται από τις χημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και τη διαθεσιμότητα ιστορικών δεδομένων για τους μάρτυρες σχετικά με τη χρήση του διαλύτη. Σε περίπτωση που χρησιμοποιούνται διαλύτες, πέραν των (αρνητικών) μαρτύρων που δεν είναι διαλύτες (μόνο νερό αραίωσης), θα πρέπει να αξιολογούνται και οι κατάλληλοι μάρτυρες με διαλύτη. Εάν δεν μπορεί να αποφευχθεί η χρήση διαλύτη και προκύψει μικροβιακή δραστηριότητα (σχηματισμός βιοϋμένων), συνιστάται η καταγραφή και η αναφορά του σχηματισμού βιοϋμένων ανά δεξαμενή (τουλάχιστον σε εβδομαδιαία βάση) σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Ιδανικά, η συγκέντρωση του διαλύτη θα πρέπει να διατηρείται σταθερή στον μάρτυρα με διαλύτη και σε όλες τις αγωγές της δοκιμής. Εάν η συγκέντρωση του διαλύτη δεν διατηρηθεί σταθερή, στον μάρτυρα με διαλύτη θα πρέπει να χρησιμοποιείται η υψηλότερη συγκέντρωση διαλύτη στην αγωγή της δοκιμής. Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται διαλύτης ως φορέας, οι μέγιστες συγκεντρώσεις του διαλύτη δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τα 100 μl/l ή τα 100 mg/l (15), και συνιστάται η συγκέντρωση του διαλύτη να είναι όσον το δυνατόν πιο χαμηλή (π.χ. < 20 μl/l) για να αποφεύγονται πιθανές επιδράσεις του διαλύτη στις μετρούμενες παραμέτρους (16).

Πειραματόζωα

Επιλογή και διατήρηση ψαριών

16. Το επιλεγμένο είδος δοκιμής είναι το ιαπωνικό ρυζόψαρο *Oryzias latipes*, λόγω του σύντομου κύκλου ζωής του και της δυνατότητας προσδιορισμού του γενετικού φύλου. Παρότι για άλλα μικρά είδη ψαριών μπορούν να προσαρμοστούν παρεμφερή πρωτόκολλα δοκιμής, οι συγκεκριμένες μέθοδοι και οι παράμετροι βάσει παρατήρησης που περιγράφονται αναλυτικά στην παρούσα μέθοδο δοκιμών αφορούν μόνο το ιαπωνικό ρυζόψαρο (βλ. παράγραφο 1). Το ρυζόψαρο αναπαράγεται εύκολα σε συνθήκες αιχμαλωσίας· υπάρχουν δημοσιευμένες μέθοδοι για την εκτροφή του (17) (18) (19), καθώς και δεδομένα από δοκιμές βραχυπρόθεσμης θνησιμότητας, πρώιμων σταδίων ζωής και πλήρους κύκλου ζωής (5) (6) (8) (9) (20). Όλα τα ψάρια διατηρούνται σε φωτοπερίοδο 16 ωρών φωτός/8 ωρών σκοταδιού. Τα ψάρια τρέφονται με ζωντανές γαρίδες της άλμης, ναύπλιους από *Artemia* spp., οι οποίες μπορούν να συμπληρώνονται με τροφή του εμπορίου σε νιφάδες. Η τροφή του εμπορίου σε νιφάδες θα πρέπει να αναλύεται για τυχόν ύπαρξη ρύπων.
17. Εφόσον ακολουθούνται οι κατάλληλες πρακτικές εκτροφής, δεν απαιτείται ειδικό πρωτόκολλο καλλιέργειας. Για παράδειγμα, το ρυζόψαρο μπορεί να εκτρέφεται σε δεξαμενές 2 l, με 240 προνύμφες ανά δεξαμενή μέχρι την 4η εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση, και, στη συνέχεια, μπορεί να εκτρέφεται σε δεξαμενές 2 l, με 10 ψάρια ανά δεξαμενή μέχρι την 8η εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση, οπότε μεταφέρονται σε δεξαμενές 2 l ως ζεύγη αναπαραγωγής.

Εγκλιματισμός και επιλογή ψαριών

18. Τα ζώα της δοκιμής θα πρέπει να επιλέγονται από ένα μοναδικό εργαστηριακό απόθεμα, το οποίο έχει εγκλιματιστεί για τουλάχιστον δύο εβδομάδες πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής υπό συνθήκες ποιότητας του νερού και φωτισμού παρόμοιες με εκείνες που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή (σημείωση: αυτή η περίοδος εγκλιματισμού δεν είναι περίοδος *in situ* προέκθεσης). Συνιστάται τα ψάρια της δοκιμής να λαμβάνονται από εργαστηριακή καλλιέργεια, δεδομένου ότι η αποστολή ενήλικων ψαριών είναι αγχογόνος και μπορεί να παρεμποδίσει την αξιόπιστη ωτοκία. Τα ψάρια θα πρέπει να σιτίζονται με ναύπλιους γαρίδας της άλμης δύο φορές την ημέρα σε όλη τη διάρκεια της περιόδου διατήρησης και κατά τη φάση έκθεσης, και, συμπληρωματικά, με τροφή του εμπορίου σε νιφάδες, εάν χρειάζεται. Για να εξασφαλιστούν αρκετά πανομοιότυπα δείγματα (replicates), η δοκιμή πρέπει να ξεκινά με τουλάχιστον 42 ζεύγη αναπαραγωγής (54 ζεύγη αναπαραγωγής εάν απαιτείται χρήση μάρτυρα με διαλύτη λόγω, εν μέρει, έλλειψης ιστορικών δεδομένων που να υποστηρίζουν τη χρήση μόνου του μάρτυρα με διαλύτη). Επιπλέον, θα πρέπει να επαληθεύεται ότι κάθε ζεύγος αναπαραγωγής της F0 είναι XX-XY (δηλ. το φυσιολογικό σύνολο των χρωμοσωμάτων φύλου σε κάθε φύλο) προκειμένου να αποφεύγεται η πιθανή συμπερίληψη αρσενικών με αυθόρμητο XX (βλ. παράγραφο 39).
19. Κατά τη φάση του εγκλιματισμού, θα πρέπει να καταγράφονται οι τιμές θνησιμότητας στα ψάρια της καλλιέργειας και να εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια μετά από μία πρώτη περίοδο 48 ωρών:
- θνησιμότητες άνω του 10 % επί του πληθυσμού καλλιέργειας κατά τις επτά ημέρες που προηγούνται της μεταφοράς στο σύστημα δοκιμής: απορρίπτεται ολόκληρη η παρτίδα,
 - θνησιμότητες μεταξύ 5 % και 10 % επί του πληθυσμού κατά τις επτά ημέρες που προηγούνται της μεταφοράς στο σύστημα δοκιμής: εγκλιματισμός επί επτά ημέρες, επιπλέον της περιόδου εγκλιματισμού 2 εβδομάδων· εάν, κατά τη διάρκεια του δεύτερου επταημέρου, καταγραφεί ποσοστό θνησιμότητας άνω του 5 %, απορρίπτεται ολόκληρη η παρτίδα,
 - θνησιμότητες κάτω του 5 % επί του πληθυσμού κατά τις επτά ημέρες που προηγούνται της μεταφοράς στο σύστημα δοκιμής: η παρτίδα γίνεται αποδεκτή.
20. Τα ψάρια δεν θα πρέπει να λαμβάνουν αγωγή για ασθένεια κατά τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού δύο εβδομάδων που προηγείται της δοκιμής και κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης, και, ει δυνατόν, η αγωγή για ασθένεια θα πρέπει να αποφεύγεται τελείως. Τα ψάρια με κλινικά σημεία ασθένειας δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται στη μελέτη. Θα πρέπει να τηρείται αρχείο παρατηρήσεων και τυχόν προφυλακτικών και θεραπευτικών αγωγών για ασθένειες κατά την περίοδο της καλλιέργειας που προηγείται της δοκιμής.

21. Η φάση της έκθεσης θα πρέπει να ξεκινά με γενετικά φυλοκαθορισμένα ενήλικα ψάρια με φυλετικό διμορφισμό, προερχόμενα από εργαστηριακή πηγή αναπαραγωγικά ώριμων ζώων καλλιεργηθέντων σε 25 ± 2 °C. Τα ψάρια θα πρέπει να είναι αποδεδειγμένοι γεννήτορες (δηλ. να έχουν παράξει βιώσιμους απογόνους) στη διάρκεια της εβδομάδας που προηγείται της έκθεσης. Για το σύνολο της παρτίδας ψαριών που χρησιμοποιείται στη δοκιμή, το εύρος βάρους σώματος ανά άτομο για αρσενικά και θηλυκά ψάρια στην έναρξη της δοκιμής θα πρέπει να διατηρείται εντός του ± 20 % του αριθμητικού μέσου βάρους του ίδιου φύλου. Πριν από τη δοκιμή συνιστάται να ζυγίζεται ένα μερικό δείγμα των ψαριών, για να εκτιμάται το μέσο βάρος. Τα ψάρια που επιλέγονται θα πρέπει να είναι ηλικίας τουλάχιστον 12 εβδομάδων μετά τη γονιμοποίηση και βάρους ≥ 300 mg για τα θηλυκά και ≥ 250 mg για τα αρσενικά.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Συγκεντρώσεις δοκιμής

22. Συνιστάται να χρησιμοποιούνται πέντε συγκεντρώσεις της χημικής ουσίας, συν τον μάρτυρα/-ες. Κατά την επιλογή του εύρους συγκεντρώσεων δοκιμής, θα πρέπει να εξετάζονται όλες οι πηγές πληροφοριών, συμπεριλαμβανομένων των ποσοτικών σχέσεων δομής-δραστικότητας (QSAR), των συγκρίσεων με στοιχεία για ουσίες ανάλογης χημικής δομής, των αποτελεσμάτων δοκιμών σε ψάρια όπως δοκιμασίες οξείας θνησιμότητας (κεφάλαιο Γ.1 του παρόντος παραρτήματος), της βραχυπρόθεσμης δοκιμασίας αναπαραγωγής (κεφάλαιο Γ.48 του παρόντος παραρτήματος) και άλλων μεθόδων δοκιμών, π.χ. κεφάλαια Γ.15, Γ.37, Γ.41, Γ.47 ή Γ.49 του παρόντος παραρτήματος (21) (22) (23) (24) (25) (26), εάν υπάρχουν, ή, εφόσον απαιτείται, οι πληροφορίες από δοκιμή προσδιορισμού του εύρους, η οποία περιλαμβάνει, πιθανώς, μία φάση αναπαραγωγής. Εφόσον απαιτείται, η δοκιμή προσδιορισμού του εύρους μπορεί να διεξάγεται υπό συνθήκες (υδατοδιαλυτότητα, σύστημα δοκιμής, πληθυσμιακός φόρτος ζώων) παρόμοιες με εκείνες που χρησιμοποιούνται για την οριστική δοκιμή. Εάν είναι απαραίτητη η χρήση διαλύτη και δεν υπάρχουν διαθέσιμα ιστορικά δεδομένα, η δοκιμή προσδιορισμού του εύρους μπορεί να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της καταλληλότητας του διαλύτη. Η υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει την τιμή υδατοδιαλυτότητας, 10 mg/l ή 1/10ο της 96h-LC50 (27). Η χαμηλότερη συγκέντρωση θα πρέπει να είναι χαμηλότερη από την υψηλότερη συγκέντρωση κατά παράγοντα ίσο με 10 έως 100. Η χρήση πέντε συγκεντρώσεων στην παρούσα δοκιμή επιτρέπει όχι μόνο τη μέτρηση των σχέσεων δόσης-απόκρισης, αλλά και τον υπολογισμό της κατώτατης συγκέντρωσης στην οποία παρατηρούνται επιπτώσεις (LOEC) και της NOEC, οι οποίες είναι απαραίτητες για την εκτίμηση του κινδύνου σε ορισμένα κανονιστικά προγράμματα ή δικαιοδοσίες. Γενικά, ο συντελεστής απόστασης μεταξύ των ονομαστικών

συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μεταξύ γειτονικών επιπέδων αγωγής είναι $\leq 3,2$.

Πανομοιότυπα δείγματα εντός των ομάδων αγωγής και των μαρτύρων

23. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον έξι θάλαμοι δοκιμής πανομοιότυπου δείγματος ανά συγκέντρωση δοκιμής (βλ. προσάρτημα 7). Κατά τη φάση αναπαραγωγής (εκτός της γενεάς F0), η δομή πανομοιότυπων δειγμάτων διπλασιάζεται με σκοπό την αξιολόγηση της γεννητικότητας και κάθε πανομοιότυπο δείγμα περιλαμβάνει ένα μόνο ζεύγος αναπαραγωγής (βλ. παράγραφο 42).
24. Εκτός από τις συγκεντρώσεις δοκιμής, θα πρέπει να ελέγχεται μάρτυρας νερού αραίωσης και, εφόσον απαιτείται, μάρτυρας με διαλύτη. Προκειμένου να διασφαλίζεται επαρκής στατιστική ισχύς, θα πρέπει να χρησιμοποιείται διπλάσιος αριθμός θαλάμων πανομοιότυπων δειγμάτων για τους μάρτυρες (θα πρέπει δηλαδή να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δώδεκα πανομοιότυπα δείγματα για τους μάρτυρες). Κατά τη φάση της αναπαραγωγής, ο αριθμός των πανομοιότυπων δειγμάτων στους μάρτυρες διπλασιάζεται (δηλαδή τουλάχιστον 24 πανομοιότυπα δείγματα, με ένα μόνο ζεύγος ζευγαρώματος σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα). Μετά την αναπαραγωγή, τα πανομοιότυπα δείγματα μαρτύρων δεν θα πρέπει να περιλαμβάνουν πάνω από 20 έμβρυα (ψάρια).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Έναρξη της δοκιμής

25. Τα αναπαραγωγικώς ενεργά ενήλικα ψάρια που χρησιμοποιούνται για το ξεκίνημα της γενεάς F0 της δοκιμής επιλέγονται με βάση τα ακόλουθα δύο κριτήρια: ηλικία (συνήθως άνω των 12 εβδομάδων μετά τη γονιμοποίηση, αλλά όχι άνω των 16 εβδομάδων μετά τη γονιμοποίηση) και βάρος (τα θηλυκά θα πρέπει να είναι ≥ 300 mg και τα αρσενικά ≥ 250 mg).
26. Τα ζεύγη θηλυκών-αρσενικών που πληρούν τις ανωτέρω προδιαγραφές μετακινούνται ως μεμονωμένα ζεύγη σε κάθε δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος, δηλαδή δώδεκα δείγματα στους μάρτυρες και έξι δείγματα στις αγωγές με τη χημική ουσία κατά την έναρξη της δοκιμής. Στις εν λόγω δεξαμενές αντιστοιχίζεται τυχαία μια αγωγή (π.χ. T1-T5 και μάρτυρας) και ένα πανομοιότυπο δείγμα (π.χ. A-L στους μάρτυρες και A-F στην αγωγή) και, στη συνέχεια, οι δεξαμενές τοποθετούνται στο σύστημα έκθεσης με την κατάλληλη ροή σε κάθε δεξαμενή.

Συνθήκες έκθεσης

27. Πλήρης σύννοψη των παραμέτρων και των συνθηκών της δοκιμής διατίθεται στο προσάρτημα 3. Η τήρηση των εν λόγω προδιαγραφών αναμένεται να έχει ως αποτέλεσμα

ψάρια μάρτυρες με τιμές παραμέτρων παρεμφερείς με εκείνες που απαριθμούνται στο προσάρτημα 4.

28. Στη διάρκεια της δοκιμής, θα πρέπει να μετράται το διαλυμένο οξυγόνο, το pH και η θερμοκρασία σε τουλάχιστον ένα δοχείο δοκιμής κάθε ομάδας αγωγής και του μάρτυρα. Οι εν λόγω μετρήσεις, εκτός της μέτρησης της θερμοκρασίας, θα πρέπει να πραγματοποιούνται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Η μέση θερμοκρασία του νερού σε όλη τη διάρκεια της μελέτης θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 24 και 26°C. Η θερμοκρασία θα πρέπει να μετράται κάθε ημέρα, σε όλη τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Το pH του νερού θα πρέπει να είναι της τάξεως του 6,5 έως 8,5, κατά τη διάρκεια όμως μιας δεδομένης δοκιμής δεν θα πρέπει να αποκλίνει πέραν των $\pm 0,5$ μονάδων pH. Τα πανομοιότυπα δείγματα εντός μιας ορισμένης αγωγής δεν θα πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους από στατιστικής άποψης, και οι ομάδες αγωγής δεν θα πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους από στατιστικής άποψης (με βάση τις καθημερινές μετρήσεις της θερμοκρασίας, και χωρίς να λαμβάνονται υπόψη τυχόν σύντομες αποκλίσεις).

Διάρκεια της έκθεσης

29. Κατά τη δοκιμή εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία ώριμα για αναπαραγωγή ψάρια της γενεάς F0 επί τρεις εβδομάδες. Την 4η εβδομάδα και την 24η περίπου ημέρα δοκιμής δημιουργείται η F1, τα ζεύγη αναπαραγωγής της F0 θανατώνονται με ευθανασία, και το βάρος και το μήκος τους καταγράφονται (βλ. παράγραφο 34). Στη συνέχεια, ξεκινά η έκθεση της γενεάς F1 επί 14 επιπλέον εβδομάδες (συνολικά 15 εβδομάδες για την F1) και της γενεάς F2 επί δύο εβδομάδες μέχρι την εκκόλαψη. Η συνολική διάρκεια της δοκιμής είναι κατά κανόνα 19 εβδομάδες (δηλ. μέχρι την εκκόλαψη της F2). Τα χρονοδιαγράμματα της δοκιμής φαίνονται στον πίνακα 2 και επεξηγούνται διεξοδικά στο προσάρτημα 9.

Πρόγραμμα σίτισης

30. Τα ψάρια μπορούν να σιτίζονται με γαρίδες της άλμης *Artemia* spp. (ναύπλιοι ηλικίας 24 ωρών) κατά βούληση, και, συμπληρωματικά, με τροφή του εμπορίου σε νιφάδες, εάν χρειάζεται. Η τροφή σε νιφάδες θα πρέπει να αναλύεται τακτικά για τυχόν ύπαρξη ρύπων όπως οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα, πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΠΑΥ) και πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCB). Θα πρέπει να αποφεύγονται τροφές με αυξημένα επίπεδα ουσιών που επιδρούν στο ενδοκρινικό σύστημα (δηλ., φυτοοιστρογόνα) η οποία θα μπορούσε να υπονομεύσει την απόκριση της δοκιμής. Τα υπολείμματα των τροφών και τα περιττώματα θα πρέπει να απομακρύνονται από τα δοκιμαστικά δοχεία όπως απαιτείται, π.χ. με προσεκτικό καθαρισμό του πυθμένα κάθε δεξαμενής με σιφόνιο. Επίσης, θα πρέπει να καθαρίζονται μία ή δύο φορές την εβδομάδα οι πλευρές και ο πυθμένας κάθε δεξαμενής (π.χ. μέσω ξέσης με σπάτουλα). Παράδειγμα προγράμματος σίτισης διατίθεται στο προσάρτημα 5. Ο ρυθμός σίτισης βασίζεται στον αριθμό ψαριών ανά πανομοιότυπο

δείγμα. Ως εκ τούτου, εάν παρατηρηθούν θάνατοι σε ένα πανομοιότυπο δείγμα, ο ρυθμός σίτισης μειώνεται.

Αναλυτικός προσδιορισμός και μετρήσεις

31. Πριν από την έναρξη της περιόδου έκθεσης, θα πρέπει να διασφαλίζεται η ορθή λειτουργία του συστήματος παροχής της χημικής ουσίας. Όλες οι αναλυτικές μέθοδοι που απαιτούνται θα πρέπει να είναι καθιερωμένες και θα πρέπει να υπάρχουν επαρκείς γνώσεις σχετικά με τη χημική σταθερότητα στο σύστημα δοκιμής. Στη διάρκεια της δοκιμής, οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας προσδιορίζονται ανά κατάλληλα χρονικά διαστήματα, κατά προτίμηση τουλάχιστον κάθε εβδομάδα σε ένα πανομοιότυπο δείγμα για κάθε ομάδα αγωγής, με κυκλική εναλλαγή μεταξύ των δειγμάτων της ίδιας ομάδας αγωγής κάθε εβδομάδα.
32. Στη διάρκεια της δοκιμής, οι ρυθμοί ροής του αραιωτικού μέσου και του αποθεματικού διαλύματος θα πρέπει να ελέγχονται σε αντίστοιχα χρονικά διαστήματα (π.χ. τουλάχιστον τρεις φορές την εβδομάδα). Συνιστάται τα αποτελέσματα να βασίζονται σε μετρηθείσες συγκεντρώσεις. Ωστόσο, εάν η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα έχει διατηρηθεί ικανοποιητικά εντός του $\pm 20\%$ των μέσων μετρηθεισών τιμών καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής, τα αποτελέσματα μπορούν να βασίζονται στις ονομαστικές ή στις μετρηθείσες τιμές. Σε περίπτωση χημικών ουσιών που εμφανίζουν σημαντική συσσώρευση στα ψάρια, οι συγκεντρώσεις δοκιμής μπορούν να μειώνονται καθώς αναπτύσσονται τα ψάρια. Σε αυτές τις περιπτώσεις, συνιστάται ο ρυθμός ανανέωσης του διαλύματος δοκιμής σε κάθε θάλαμο να προσαρμόζεται ώστε να διατηρείται όσο το δυνατόν περισσότερο η σταθερότητα των συγκεντρώσεων δοκιμής.

Παρατηρήσεις και μετρούμενες παράμετροι

33. Οι μετρούμενες παράμετροι είναι η γεννητικότητα, η γονιμότητα, η εκκόλαψη, η σωματική αύξηση και η επιβίωση με σκοπό την αξιολόγηση των δυνητικών επιδράσεων στο επίπεδο του πληθυσμού. Επίσης, θα πρέπει να παρατηρείται καθημερινά η συμπεριφορά και να καταγράφεται τυχόν ασυνήθης συμπεριφορά. Άλλες παράμετροι που σχετίζονται με τον μηχανισμό δράσης είναι τα ηπατικά επίπεδα mRNA του γονιδίου *vtg* ή τα επίπεδα της πρωτεΐνης VTG που προσδιορίζονται μέσω ανοσοδοκιμασίας (28), οι φαινοτυπικοί δείκτες φύλου όπως οι χαρακτηριστικές θηλοειδείς αποφύσεις του εδρικού πτερυγίου των αρσενικών, η ιστολογική αξιολόγηση του γοναδικού φύλου, και η αξιολόγηση της ιστοπαθολογικής εικόνας του νεφρού, του ήπατος και της γονάδας (βλ. κατάλογο παραμέτρων στον πίνακα 1). Όλες οι ειδικές παράμετροι αξιολογούνται στο πλαίσιο προσδιορισμού του γενετικού φύλου του ατόμου, βάσει της παρουσίας ή απουσίας του γονιδίου *dmy* που καθορίζει το φύλο των αρσενικών ρυζόψαρων (βλ. παράγραφο 41). Επιπλέον, αξιολογείται ο χρόνος μέχρι την ωοτοκία. Επίσης, μπορούν να εξαχθούν απλές αναλογίες των φαινοτυπικών φύλων βάσει των στοιχείων μετρήσεων των θηλοειδών

αποφύσεων εδρικού πτερυγίου με σκοπό να προσδιοριστούν μεμονωμένα άτομα ρυζόψαρων ως φαινοτυπικώς αρσενικά ή θηλυκά. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν προορίζεται για την ανίχνευση μικρών αποκλίσεων από την αναμενόμενη αναλογία των φύλων, διότι οι σχετικά μικροί αριθμοί ψαριών ανά πανομοιότυπο δείγμα δεν παρέχουν επαρκή στατιστική ισχύ. Επίσης, στη διάρκεια της ιστοπαθολογικής αξιολόγησης, αξιολογείται η γονάδα και διεξάγονται πολύ πιο ισχυρές στατιστικά αναλύσεις για την αξιολόγηση του γοναδικού φαινοτύπου στο πλαίσιο του γενετικού φύλου.

34. Ο κύριος σκοπός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι η αξιολόγηση των δυνητικών επιδράσεων μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας που σχετίζονται με τον πληθυσμό. Οι παράμετροι που σχετίζονται με τον μηχανισμό δράσης (VTG, SSC και ορισμένες επιδράσεις στην ιστοπαθολογία των γονάδων) μπορούν επίσης να συμβάλουν στον προσδιορισμό του κατά πόσον κάποια επίδραση μεσολαβείται από ενδοκρινική δραστηριότητα. Ωστόσο, οι εν λόγω παράμετροι μπορούν επίσης να επηρεάζονται από συστηματικές και άλλες τοξικότητες. Κατά συνέπεια, μπορεί επίσης να αξιολογείται διεξοδικά η ιστοπαθολογία του ήπατος και των νεφρών με σκοπό την καλύτερη κατανόηση τυχόν αποκρίσεων στις παραμέτρους μηχανισμού δράσης. Εντούτοις, ακόμη κι αν δεν διεξαχθούν αυτές οι αναλυτικές αξιολογήσεις, τυχόν μακροσκοπικές ανωμαλίες που παρατηρούνται περιστασιακά κατά την ιστοπαθολογική αξιολόγηση θα πρέπει να καταγράφονται και να περιλαμβάνονται στην έκθεση δοκιμής.

Θανάτωση των ψαριών με ευθανασία

35. Κατά τη λήξη της έκθεσης των γενεών F0 και F1, όταν πραγματοποιείται μερική δειγματοληψία των ψαριών που βρίσκονται πριν την ενηλικίωση, τα ψάρια θα πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία με κατάλληλες ποσότητες αναισθητικού διαλύματος [π.χ. μεθανοσουλφονικής τρικαΐνης, MS-222 (CAS.886-86-2), 100-500 mg/l] στο οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα NaHCO_3 (διττανθρακικό νάτριο, CAS.144-55-8) 300 mg/l για τον περιορισμό του ερεθισμού του βλεννογόνου. Εάν τα ψάρια εμφανίζουν συμπτώματα έντονης οδύνης (μπορεί να προβλεφθεί με ασφάλεια η πρόκληση ιδιαίτερα έντονης οδύνης και θανάτου) και θεωρούνται ετοιμοθάνατα, πρέπει να αναισθητοποιούνται και να θανατώνονται με ευθανασία, και να συγκαταλέγονται στην παράμετρο της θνησιμότητας στο πλαίσιο της ανάλυσης δεδομένων. Όταν ένα ψάρι θανατώνεται με ευθανασία λόγω νοσηρότητας, αυτό θα πρέπει να καταγράφεται και να περιλαμβάνεται στην έκθεση δοκιμής. Ανάλογα με τη χρονική στιγμή στη διάρκεια της μελέτης κατά την οποία θανατώνεται το ψάρι, μπορεί να διατηρείται με σκοπό τη διεξαγωγή ιστοπαθολογικής ανάλυσης (μονιμοποίηση του ψαριού για την πιθανή διενέργεια ιστοπαθολογικής ανάλυσης).

Χειρισμός των αυγών και των προνυμφών

Συλλογή των αυγών από τα ζεύγη ζευγαρώματος για τον πολλαπλασιασμό της επόμενης γενεάς

36. Η συλλογή των αυγών πραγματοποιείται την πρώτη ημέρα (ή τις πρώτες δύο ημέρες, εφόσον απαιτείται) της 4ης εβδομάδας δοκιμής για τη μετάβαση από την F0 στην F1, και της 18ης εβδομάδας δοκιμής για τη μετάβαση από την F1 στην F2. Η 18η εβδομάδα δοκιμής αντιστοιχεί σε ενήλικα ψάρια F1, ηλικίας 15 εβδομάδων μετά τη γονιμοποίηση. Είναι σημαντικό, πριν από την ημέρα έναρξης συλλογής των αυγών, να απομακρύνονται όλα τα αυγά από κάθε δεξαμενή, προκειμένου να διασφαλίζεται ότι όλα τα αυγά που συλλέγονται από ένα ζεύγος ζευγαρώματος προέρχονται από την ίδια ωοτοκία. Μετά την ωοτοκία, το θηλυκό ρυζόψαρο μεταφέρει μερικές φορές τα αυγά του κοντά στον ουρογεννητικό πόρο μέχρι να τα αποθέσει σε υπόστρωμα. Εάν δεν υπάρχει υπόστρωμα στη δεξαμενή, τα αυγά βρίσκονται είτε επάνω στο θηλυκό είτε στον πυθμένα της δεξαμενής. Ανάλογα με το σημείο στο οποίο βρίσκονται, τα αυγά είτε αποσπώνται προσεκτικά από το θηλυκό είτε απομακρύνονται με σιφωνισμό από τον πυθμένα την 4η εβδομάδα δοκιμής για την F0 και τη 18η εβδομάδα δοκιμής για την F1. Όλα τα αυγά που συλλέγονται στο πλαίσιο μιας αγωγής συγχωνεύονται πριν από την κατανομή σε θαλάμους επώασης.
37. Τα νημάτια αυγών, που συγκρατούν τα αυγά της ωοτοκίας μαζί, θα πρέπει να απομακρύνονται. Τα γονιμοποιημένα αυγά (έως 20) συλλέγονται από κάθε ζεύγος ζευγαρώματος (1 ζεύγος ανά πανομοιότυπο δείγμα), συγχωνεύονται ανά αγωγή και κατανέμονται συστηματικά σε κατάλληλους θαλάμους επώασης (προσάρτημα 6, 7). Με χρήση μικροσκοπίου ανατομών καλής ποιότητας, μπορούν να διαπιστωθούν τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της πρώιμης γονιμοποίησης/ανάπτυξης όπως η ανύψωση της μεμβράνης γονιμοποίησης (χόριο), η εξελισσόμενη διαίρεση των κυττάρων, ή ο σχηματισμός του βλαστιδίου. Οι θάλαμοι επώασης μπορούν να τοποθετούνται σε χωριστά «ενυδρεία επώασης» που διαμορφώνονται για κάθε αγωγή (στα οποία θα πρέπει να μετρώνται οι παράμετροι ποιότητας του νερού και οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας), ή στο ενυδρείο στο οποίο θα τοποθετηθούν οι εκκολαφθείσες προνύμφες (λεκιθοφόρα ιχθύδια). Σε περίπτωση που η συλλογή πρέπει να συνεχιστεί και για δεύτερη ημέρα (ημέρα δοκιμής 23), όλα τα αυγά και από τις δύο ημέρες θα πρέπει να συγχωνεύονται και, στη συνέχεια, να κατανέμονται συστηματικά σε όλα τα πανομοιότυπα δείγματα της αγωγής.

Εκτροφή των αυγών μέχρι την εκκόλαψη

38. Τα γονιμοποιημένα αυγά ανακινούνται διαρκώς, π.χ. μέσα στον επωαστήρα αυγών με φυσαλίδες αέρα ή μέσω κατακόρυφης ταλάντωσης του επωαστήρα αυγών. Οι θνησιμότητες των γονιμοποιημένων αυγών (εμβρύων) ελέγχονται και καταγράφονται καθημερινά. Τα νεκρά αυγά απομακρύνονται από τους επωαστήρες (προσάρτημα 9). Την 7η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση, η ανακίνηση διακόπτεται ή μειώνεται, ούτως ώστε τα γονιμοποιημένα αυγά να κατακαθίσουν στον πυθμένα του επωαστήρα. Κατ' αυτόν τον

τρόπο υποστηρίζεται η εκκόλαψη, συνήθως τις επόμενες μία ή δύο ημέρες. Οι νεαρές προνύμφες (λεκιθοφόρα ιχθύδια) καταγράφονται (συγχωνευμένα για κάθε πανομοιότυπο δείγμα) για κάθε αγωγή και μάρτυρα. Τα γονιμοποιημένα αυγά που δεν έχουν εκκολαφθεί σε χρονικό διάστημα διπλάσιο αυτού της διάμεσης ημέρας εκκόλαψης στον μάρτυρα (συνήθως η 16η ή η 18η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση) θεωρούνται μη βιώσιμα και απορρίπτονται.

39. Σε κάθε δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος μεταφέρονται δώδεκα ιχθύδια. Τα ιχθύδια από τους θαλάμους επώασης συγχωνεύονται και κατανέμονται συστηματικά σε δεξαμενές πανομοιότυπων δειγμάτων (προσάρτημα 7). Αυτό μπορεί να πραγματοποιείται μέσω τυχαίας επιλογής ενός ιχθυδίου από τον πληθυσμό αγωγής και μέσω της διαδοχικής προσθήκης σε ένα ενυδρείο ενός ιχθυδίου τη φορά, χωρίς να γίνεται διάκριση ως προς τα χαρακτηριστικά του. Καθεμία από τις δεξαμενές θα πρέπει να περιέχει ίσο αριθμό ($n=12$) εκκολαφθεισών προνυμφών (20 προνύμφες σε κάθε δεξαμενή κατά μέγιστο). Εάν ο αριθμός των ιχθυδίων δεν επαρκεί για την πλήρωση όλων των πανομοιότυπων δειγμάτων της αγωγής, συνιστάται να διασφαλίζεται η πλήρωση όσο το δυνατόν περισσότερων επαναλήψεων με 12 ιχθύδια. Ο χειρισμός των ιχθυδίων μπορεί να γίνει με ασφάλεια με γυάλινες πιπέτες μεγάλης διαμέτρου. Τυχόν πλεονάζοντα ιχθύδια θανατώνονται με ευθανασία με αναισθητικό. Στη διάρκεια των λίγων εβδομάδων πριν από τη διαμόρφωση των ζευγών ζευγαρώματος, θα πρέπει να καταγράφεται η ημέρα κατά την οποία παρατηρείται το πρώτο συμβάν ωτοκίας σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα.

Διαμόρφωση των ζευγών ζευγαρώματος

Αποκοπή πτερυγίου και προσδιορισμός του γονοτυπικού φύλου

40. Ο προσδιορισμός του γονοτυπικού φύλου μέσω αποκοπών πτερυγίου πραγματοποιείται την 9η-10η εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση (δηλαδή τη 12η-13η εβδομάδα δοκιμής για τη γενεά F1). Όλα τα ψάρια σε μία δεξαμενή αναισθητοποιούνται (με χρήση εγκεκριμένων μεθόδων, π.χ. IACUC) και λαμβάνεται ένα μικρό δείγμα ιστού είτε από το ραχιαίο είτε από το κοιλιακό άκρο του ουραίου πτερυγίου κάθε ψαριού, προκειμένου να προσδιοριστεί το γονοτυπικό φύλο του ατόμου (29). Τα ψάρια ενός πανομοιότυπου δείγματος μπορούν να στεγάζονται σε μικρούς κλωβούς, κατά προτίμηση ένα ανά κλωβό, στη δεξαμενή. Εναλλακτικά, μπορούν να διατηρούνται δύο ψάρια σε κάθε κλωβό, εφόσον διακρίνονται μεταξύ τους. Μία μέθοδος είναι η διαφοροποίηση του σημείου αποκοπής στο ουραίο πτερύγιο (π.χ. ραχιαίου έναντι κοιλιακού άκρου) κατά τη λήψη του δείγματος ιστού.
41. Το γονοτυπικό φύλο του ρυζόψαρου καθορίζεται από ένα αναγνωρισμένο και αλληλουχημένο γονίδιο (*dmy*), το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα Y. Η παρουσία του *dmy* υποδεικνύει άτομο XY ανεξάρτητα από τον φαινότυπο, ενώ η απουσία του *dmy* υποδεικνύει άτομο XX ανεξάρτητα από τον φαινότυπο (30), (31). Από κάθε πτερύγιο

εξάγεται το δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) και η παρουσία ή η απουσία του *dmy* μπορεί να προσδιοριστεί με μεθόδους αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) [ανατρέξτε στο προσάρτημα 9 του κεφαλαίου Γ.41 του παρόντος παραρτήματος, ή στο προσάρτημα 3 και 4 στην παράγραφο (29)].

Δημιουργία των ζευγών ζευγαρώματος

42. Οι πληροφορίες για το γονοτυπικό φύλο χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία ζευγών ζευγαρώματος XX-XY ανεξάρτητα από τον εξωτερικό φαινότυπο, οποίος μπορεί να έχει αλλοιωθεί λόγω της έκθεσης σε υπό δοκιμή χημική ουσία. Την ημέρα μετά τον προσδιορισμό του γονοτυπικού φύλου κάθε ψαριού, επιλέγονται τυχαία δύο ψάρια XX και δύο ψάρια XY από κάθε πανομοιότυπο δείγμα και δημιουργούνται δύο ζεύγη ζευγαρώματος XX-XY. Εάν ένα πανομοιότυπο δείγμα δεν διαθέτει είτε δύο ψάρια XX είτε δύο ψάρια XY, τα κατάλληλα ψάρια θα πρέπει να λαμβάνονται από άλλα πανομοιότυπα δείγματα της ίδιας αγωγής. Αυτό που έχει σημασία είναι σε κάθε αγωγή και στους μάρτυρες (24) να υπάρχει ο συνιστώμενος αριθμός ζευγών ζευγαρώματος ανά πανομοιότυπο δείγμα (12). Κατά τη δημιουργία των ζευγών ζευγαρώματος αποκλείονται τα ψάρια με εμφανείς ανωμαλίες (προβλήματα νυκτικής κύστης, παραμορφώσεις της σπονδυλικής στήλης, ακραίες διακυμάνσεις μεγέθους κ.λπ.). Κατά την αναπαραγωγική φάση της F1, κάθε δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος θα πρέπει να περιέχει ένα μόνο ζεύγος ζευγαρώματος.

Δειγματοληψία ψαριών πριν την ενηλικίωση και αξιολόγηση παραμέτρων

Δειγματοληψία ψαριών που δεν ανήκουν στα ζεύγη ζευγαρώματος

43. Μετά τη διαμόρφωση των ζευγών ζευγαρώματος, τα ψάρια που δεν έχουν επιλεγεί για περαιτέρω αναπαραγωγή θανατώνονται με ευθανασία προκειμένου να μετρηθούν οι παράμετροι πριν την ενηλικίωση, τη 12η-13η εβδομάδα δοκιμής (F1). Είναι εξαιρετικά σημαντικό ο χειρισμός των ψαριών να πραγματοποιείται με τέτοιο τρόπο ώστε να εξακολουθεί να είναι γνωστό το γονοτυπικό φύλο που είχε προσδιοριστεί για κάθε άτομο κατά την επιλογή των ζευγών ζευγαρώματος. Όλα τα δεδομένα που συλλέχθηκαν αναλύονται στο πλαίσιο του γονοτυπικού φύλου του συγκεκριμένου ψαριού. Κάθε ψάρι χρησιμοποιείται για διάφορες μετρήσεις παραμέτρων, όπως οι ακόλουθες: προσδιορισμός των ποσοστών επιβίωσης ιχθυδίων/ψαριών πριν την ενηλικίωση [εβδομάδες δοκιμής 7-12/13 (F1)], της αύξησης σε μήκος (σε περίπτωση αποκοπής του ουραίου πτερυγίου λόγω δειγματοληψίας για ανάλυση του γενετικού φύλου, μπορεί να μετράται το τυπικό μήκος. Το ολικό μήκος μπορεί να μετράται εφόσον είχε ληφθεί μόνο ένα τμήμα –ραχιαίο ή κοιλιακό– του ουραίου πτερυγίου για τον προσδιορισμό του *dmy*), της μάζας σώματος (δηλ. νωπό βάρος, στέγνωμα με απορροφητικό χαρτί), του ηπατικού *vtg* mRNA (ή της VTG) και των θηλοειδών αποφύσεων εδρικού πτερυγίου (βλ. πίνακες 1 και 2).

Επισημαίνεται ότι τα βάρη και τα μήκη των ζευγών ζευγαρώματος είναι επίσης απαραίτητα για τον υπολογισμό της μέσης σωματικής αύξησης της ομάδας αγωγής.

Δειγματοληψία ιστών και μέτρηση λεκιθογενίνης

44. Το ήπαρ ανατέμνεται και φυλάσσεται στους ≤ -70 °C μέχρι να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις του *vtg* mRNA (ή της VTG). Η ουρά του ψαριού, περιλαμβανομένου του εδρικού πτερυγίου, διατηρείται σε κατάλληλο μέσο μονιμοποίησης (π.χ. Davidson) ή φωτογραφίζεται ώστε να είναι εφικτή η μέτρηση των θηλοειδών αποφύσεων εδρικού πτερυγίου αργότερα. Εφόσον είναι επιθυμητό, σε αυτό το στάδιο μπορεί να πραγματοποιείται δειγματοληψία και διατήρηση άλλων ιστών (δηλ. γονάδας) σε μέσο μονιμοποίησης. Θα πρέπει να προσδιορίζεται ποσοτικά η συγκέντρωση της ηπατικής VTG με ομόλογη τεχνική ELISA (βλ. τις συνιστώμενες διαδικασίες για το ρυζόψαρο στο προσάρτημα 6 του κεφαλαίου Γ.48 του παρόντος παραρτήματος). Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιούνται οι μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού του *vtg* mRNA που ανέπτυξε ο Οργανισμός Προστασίας Περιβάλλοντος (EPA) των ΗΠΑ, δηλαδή εκχύλιση του mRNA του γονιδίου *vtg* I από δείγμα ήπατος και ποσοτικός προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου *vtg* I (ανά ng συνολικού mRNA) μέσω ποσοτικής PCR (29). Αντί του προσδιορισμού του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου *vtg* στις ομάδες μαρτύρων και αγωγής, μια λιγότερο δύσκολη τεχνικά μέθοδος με χρήση λιγότερων πόρων είναι ο προσδιορισμός της σχετικής (πολλαπλάσιας) μεταβολής της έκφρασης του *vtg* I στις ομάδες μαρτύρων και αγωγής.

Δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου

45. Υπό κανονικές συνθήκες, μόνο τα σεξουαλικά ώριμα αρσενικά ρυζόψαρα διαθέτουν θηλοειδείς αποφύσεις, οι οποίες αναπτύσσονται στις αρθρικές πλάκες ορισμένων ακτίνων του εδρικού πτερυγίου ως δευτερογενές σεξουαλικό χαρακτηριστικό, και αποτελούν δυνητικό βιοδείκτη επιδράσεων ενδοκρινικών διαταρακτών. Η μέθοδος καταμέτρησης των θηλοειδών αποφύσεων εδρικού πτερυγίου (ο αριθμός των ενωτικών μεμβρανών με θηλοειδείς αποφύσεις) παρατίθεται στο προσάρτημα 8. Επίσης, ο αριθμός των θηλοειδών αποφύσεων του εδρικού πτερυγίου ανά άτομο χρησιμοποιείται για την κατηγοριοποίηση του συγκεκριμένου ατόμου ως εξωτερικά φαινοτυπικού αρσενικού ή θηλυκού με σκοπό τον υπολογισμό μιας απλής αναλογίας φύλων ανά πανομοιότυπο δείγμα. Ένα ρυζόψαρο με αριθμό μεγαλύτερο του 0 ορίζεται ως αρσενικό· ένα ρυζόψαρο με 0 θηλοειδείς αποφύσεις εδρικού πτερυγίου ορίζεται ως θηλυκό.

Αξιολόγηση της γεννητικότητας και της γονιμότητας

46. Η γεννητικότητα και η γονιμότητα αξιολογούνται τις εβδομάδες δοκιμής 1 έως 3 στη γενεά F0 και τις εβδομάδες 15 έως 17 στη γενεά F1. Τα αυγά συλλέγονται καθημερινά από κάθε ζεύγος ζευγαρώματος επί 21 διαδοχικές ημέρες. Τα αυγά απομακρύνονται

προσεκτικά από τα θηλυκά, αφού αυτά παγιδευτούν με απόχη, και/ή αναρροφούνται με σифώνιο από τον πυθμένα του ενυδρείου κάθε πρωί. Η γεννητικότητα και η γονιμότητα καταγράφονται καθημερινά για κάθε ζεύγος ζευγαρώματος πανομοιότυπου δείγματος. Η γεννητικότητα ορίζεται ως ο αριθμός των αυγών ωοτοκίας, ενώ η γονιμότητα ορίζεται λειτουργικά ως ο αριθμός των γονιμοποιημένων και βιώσιμων αυγών κατά την καταμέτρηση. Η καταμέτρηση θα πρέπει να πραγματοποιείται το συντομότερο δυνατόν μετά τη συλλογή των αυγών.

47. Η γεννητικότητα πανομοιότυπου δείγματος καταγράφεται καθημερινά ως ο αριθμός των αυγών ανά ζεύγος ζευγαρώματος που αναλύεται με τις συνιστώμενες στατιστικές διαδικασίες και με χρήση των μέσων όρων των πανομοιότυπων δειγμάτων. Η γονιμότητα πανομοιότυπου δείγματος είναι το άθροισμα του αριθμού των γόνιμων αυγών που παράγει κάθε ζεύγος ζευγαρώματος διαιρούμενο διά του αθροίσματος του αριθμού των αυγών που παράγει το ζεύγος. Στατιστικά, η γονιμότητα αναλύεται ως αναλογία ανά πανομοιότυπο δείγμα. Η εκκολαψιμότητα πανομοιότυπου δείγματος είναι ο αριθμός των εκκολαφθέντων ιχθυδίων διαιρούμενος διά του πληθυσμιακού φόρτου εμβρύων (συνήθως 20). Στατιστικά, η εκκολαψιμότητα αναλύεται ως αναλογία ανά πανομοιότυπο δείγμα.

Δειγματοληψία ενήλικων ψαριών και αξιολόγηση παραμέτρων

Δειγματοληψία ψαριών ζευγών ζευγαρώματος

48. Μετά τη 17η εβδομάδα δοκιμής (δηλ. μετά την επιτυχή έναρξη της γενεάς F2), τα ενήλικα ψάρια της γενεάς F1 θανατώνονται με ευθανασία και αξιολογούνται διάφορες παράμετροι (βλ. πίνακες 1 και 2). Λαμβάνεται απεικόνιση του εδρικού πτερυγίου για την αξιολόγηση των θηλοειδών αποφύσεων εδρικού πτερυγίου (βλ. προσάρτημα 8), και/ή η ουρά, ακριβώς πίσω από την αμάρα, αφαιρείται και διατηρείται σε μέσο μονιμοποίησης για καταμέτρηση των θηλοειδών αποφύσεων αργότερα. Μπορεί να πραγματοποιηθεί δειγματοληψία τμήματος του ουραίου πτερυγίου, το οποίο αρχειοθετείται σε αυτό το στάδιο για επαλήθευση του γενετικού φύλου (*dmy*), εφόσον είναι επιθυμητό. Εφόσον απαιτείται, μπορεί να λαμβάνεται δείγμα ιστού με σκοπό την επανάληψη της ανάλυσης *dmy* με σκοπό την επαλήθευση του γενετικού φύλου συγκεκριμένου ψαριού. Ανοίγεται η σωματική κοιλότητα ώστε να επιτραπεί η διάχυση των κατάλληλων μέσων μονιμοποίησης (π.χ. Davidson), πριν από την εμβύθιση ολόκληρου του σώματος στο μέσο μονιμοποίησης. Εντούτοις, εάν έχει προηγηθεί εκτέλεση κατάλληλου σταδίου αύξησης της διαπερατότητας της μεμβράνης των κυττάρων, δεν είναι απαραίτητο να ανοιχθεί η σωματική κοιλότητα.

Ιστοπαθολογία

49. Αξιολογείται η ιστοπαθολογική εικόνα κάθε ψαριού για τον εντοπισμό παθολογικών καταστάσεων στον γοναδικό ιστό (30), (29). Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 33, άλλες σχετιζόμενες με τον μηχανισμό δράσης παράμετροι που αξιολογούνται στην παρούσα

δοκιμασία (δηλ. VTG, SSC και ορισμένες επιδράσεις στην ιστοπαθολογία των γονάδων) ενδέχεται να επηρεάζονται από συστημικές ή άλλες τοξικότητες. Κατά συνέπεια, μπορεί επίσης να αξιολογείται διεξοδικά η ιστοπαθολογία του ήπατος και των νεφρών με σκοπό την καλύτερη κατανόηση τυχόν αποκρίσεων στις παραμέτρους μηχανισμού δράσης. Εντούτοις, ακόμη κι αν δεν διεξαχθούν αυτές οι αναλυτικές αξιολογήσεις, τυχόν μακροσκοπικές ανωμαλίες που παρατηρούνται περιστασιακά κατά την ιστοπαθολογική αξιολόγηση θα πρέπει να καταγράφονται και να περιλαμβάνονται στην έκθεση δοκιμής. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια προσέγγιση «καθοδικής ανάγνωσης» από την ομάδα υψηλότερης δόσης αγωγής (σε σύγκριση με τον μάρτυρα) μέχρι τη δόση που δεν εμφανίζει επίδραση, ωστόσο καλό είναι να ανατρέχετε στο υλικό καθοδήγησης για την ιστοπαθολογία (29). Συνήθως, όλα τα δείγματα υποβάλλονται σε επεξεργασία/ανατέμνονται, και, στη συνέχεια, αξιολογούνται από τον ιστοπαθολόγο. Εάν χρησιμοποιείται προσέγγιση «καθοδικής ανάγνωσης», επισημαίνεται ότι η διαδικασία Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) βασίζεται στην προσδοκία ότι η αύξηση των επιπέδων δόσης θα συνοδεύεται επίσης από αύξηση των βιολογικών επιπτώσεων (της παθολογικής κατάστασης). Ως εκ τούτου, η στατιστική ισχύς θα μειωθεί εάν εξετάζεται μόνο μία υψηλή δόση, χωρίς ενδιάμεσες δόσεις. Σε περίπτωση που δεν είναι απαραίτητη η διενέργεια στατικής ανάλυσης προκειμένου να προσδιοριστεί ότι η υψηλή δόση δεν έχει καμία επίδραση, η προσέγγιση αυτή μπορεί να είναι αποδεκτή. Από την αξιολόγηση αυτή προκύπτει επίσης ο γοναδικός φαινότυπος

Άλλες παρατηρήσεις

50. Η δοκιμή MEOGRT παρέχει δεδομένα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν (στο πλαίσιο προσέγγισης βάρους της απόδειξης) για την ταυτόχρονη αξιολόγηση τουλάχιστον δύο τύπων οδών δυσμενούς έκβασης (AOP) που έχουν ως αποτέλεσμα εξασθένηση του αναπαραγωγικού συστήματος: α) οδοί μέσω του ενδοκρινικού συστήματος που περιλαμβάνουν τη διατάραξη του ενδοκρινικού άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων (HPG)· και β) οδοί που προκαλούν μείωση της επιβίωσης, της σωματικής αύξησης (μήκος και βάρος) και της αναπαραγωγής μέσω τοξικότητας που δεν διαμεσολαβείται από το ενδοκρινικό σύστημα. Παράμετροι που μετρώνται συνήθως στις δοκιμές χρόνιας τοξικότητας, όπως η δοκιμή πλήρους κύκλου ζωής και η δοκιμή πρώιμων σταδίων ζωής, περιλαμβάνονται και στην παρούσα δοκιμή, και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση των κινδύνων που ενέχουν τόσο οι τρόποι δράσης που δεν διαμεσολαβούνται από το ενδοκρινικό σύστημα όσο και οι οδοί τοξικότητας που διαμεσολαβούνται από το ενδοκρινικό σύστημα. Στη διάρκεια της δοκιμής, θα πρέπει να παρατηρείται καθημερινά η συμπεριφορά και να καταγράφεται τυχόν ασυνήθης συμπεριφορά. Επιπλέον, τυχόν θνησιμότητα θα πρέπει να καταγράφεται, και θα πρέπει να υπολογίζεται η επιβίωση μέχρι την απομάκρυνση των ψαριών (εβδομάδα δοκιμής 6/7), η επιβίωση μετά την απομάκρυνση μέχρι τη δειγματοληψία ψαριών πριν την ενηλικίωση (εβδομάδα μετά τη

γονιμοποίηση 9-10), και η επιβίωση από το ζευγάρωμα μέχρι τη δειγματοληψία των ενήλικων ψαριών.

Πίνακας 1: Επισκόπηση παραμέτρων της MEOGRT*

Στάδιο κύκλου ζωής	Παράμετρος	Γενιά
Έμβρυα (2 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)	Εκκόλαψη (% και χρόνος μέχρι την εκκόλαψη)	F1, F2
Ιχθύδια (4 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)	Επιβίωση	F1
Πριν την ενηλικίωση (9 ή 10 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)	Επιβίωση	F1
	Σωματική αύξηση (μήκος και βάρος)	
	Λεκιθογενίνη (mRNA ή πρωτεΐνη)	
	Δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου (θηλοειδείς αποφύσεις εδρικού πτερυγίου)	
	Αναλογία εξωτερικών σεξουαλικών χαρακτηριστικών	
	Χρόνος μέχρι την 1η ωοτοκία	
Ενήλικα άτομα (12-14 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)	Αναπαραγωγή (γεννητικότητα και γονιμότητα)	F0, F1
Ενήλικα άτομα (15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)	Επιβίωση	F1
	Σωματική αύξηση (μήκος και βάρος)	
	Δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου (θηλοειδείς αποφύσεις εδρικού πτερυγίου)	
	Ιστοπαθολογία (γονάδα, ήπαρ, νεφρός)	

* Αυτές οι παράμετροι πρέπει να αναλύονται στατιστικά

ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ

51. Στον πίνακα 2 φαίνεται το χρονοδιάγραμμα της δοκιμής MEOGRT. Η δοκιμή MEOGRT περιλαμβάνει 4 εβδομάδες έκθεσης ενήλικων ατόμων της γενεάς F0 και 15 εβδομάδες έκθεσης της γενεάς F1, και περίοδο έκθεσης για τη δεύτερη γενεά (F2), μέχρι την εκκόλαψη (2 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση). Η δραστηριότητα κατά τη διάρκεια της MEOGRT συνοψίζεται στο προσάρτημα 9.

Πίνακας 2: Χρονοδιαγράμματα της δοκιμής MEOGRT για τις παραμέτρους της έκθεσης και της μέτρησης.

Χρονοδιάγραμμα της δοκιμής MEOGRT για τις παραμέτρους της έκθεσης και της μέτρησης																			
F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																	1	2	
Εβδομάδα	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Στάδιο κύκλου ζωής				Έμβρυα				Προνύμφες				Νεαρά				Πριν την ενηλικίωση		Ενήλικα άτομα	
Παράμετροι																			
Γεννητικότητα	F ₀														F ₁				
Γονιμότητα	F ₀														F ₁				
Εκκόλαψη					F ₁													F ₂	
Επιβίωση						F ₁						F ₁						F ₁	
Σωματική αύξηση				F ₀								F ₁						F ₁	
Λεκιθογενίνη												F ₁							
Δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου												F ₁						F ₁	
Ιστοπαθολογία																		F ₁	
Εβδομάδα δοκιμής	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
- Ο σχεδιασμός του πειράματος περιλαμβάνει 7 ομάδες πανομοιότυπων δειγμάτων 5 για αγωγές με την υπό δοκιμή χημική ουσία 2 για αγωγές μάρτυρα (4 εάν χρησιμοποιείται διαλύτης) - Σχεδιασμός εντός των ομάδων 12 πανομοιότυπα δείγματα για την αναπαραγωγή, παθολογικές καταστάσεις και SSC ενήλικων ατόμων (εβδομάδες 10 έως 18) 6 πανομοιότυπα δείγματα για εκκόλαψη, επιβίωση, Vtg, και - SSC και σωματική αύξηση ατόμων πριν την ενηλικίωση (εβδομάδες 1 έως 9) SSC: δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου Vtg: λεκιθογενίνη																			

ΑΝΑΦΟΡΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Στατιστική ανάλυση

52. Δεδομένου ότι το γενετικό φύλο προσδιορίζεται για όλα τα ψάρια της δοκιμής, τα δεδομένα θα πρέπει να αναλύονται ως προς κάθε γενετικό φύλο χωριστά (δηλ. τα αρσενικά XY και τα θηλυκά XX). Αν αυτό δεν συμβεί, θα μειωθεί η στατιστική ισχύς οποιασδήποτε ανάλυσης. Για τις στατιστικές αναλύσεις των δεδομένων θα πρέπει, κατά προτίμηση, να ακολουθούνται οι διαδικασίες που περιγράφονται στο έγγραφο «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application (Τρέχουσες προσεγγίσεις στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων οικολογικότητας: Οδηγός εφαρμογής) του ΟΟΣΑ (32). Στο προσάρτημα 10 παρέχεται καθοδήγηση σχετικά με τη στατιστική ανάλυση.

53. Ο σχεδιασμός της δοκιμής και η επιλογή των στατιστικών ελέγχων θα πρέπει να παρέχουν επαρκή στατιστική ισχύ για την ανίχνευση των μεταβολών με βιολογική σημασία στις παραμέτρους για τις οποίες πρέπει να αναφερθεί NOEC (32). Η αναφορά των σχετικών αποτελεσματικών συγκεντρώσεων και παραμέτρων με επίδραση μπορεί να εξαρτάται από το κανονιστικό πλαίσιο. Σε κάθε παράμετρο θα πρέπει να προσδιορίζεται η ποσοστιαία μεταβολή που είναι σημαντικό να ανιχνευθεί ή να εκτιμηθεί. Ο πειραματικός σχεδιασμός θα πρέπει να είναι ειδικά προσαρμοσμένος έτσι ώστε να παρέχει αυτή τη δυνατότητα. Είναι απίθανο να ισχύει η ίδια ποσοστιαία μεταβολή για όλες τις παραμέτρους, ούτε είναι εφικτό να σχεδιαστεί ένα πείραμα που θα πληροί αυτά τα κριτήρια για όλες τις παραμέτρους και, ως εκ τούτου, έχει σημασία για τον κατάλληλο σχεδιασμό του πειράματος η εστίαση στις παραμέτρους που είναι σημαντικές για το αντίστοιχο πείραμα. Στο προσάρτημα 10 διατίθεται ένα στατιστικό διάγραμμα ροής και καθοδήγηση που βοηθούν στην επεξεργασία των δεδομένων και στην επιλογή του καταλληλότερου προς χρήση στατιστικού ελέγχου ή μοντέλου. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες στατιστικές προσεγγίσεις, εφόσον αυτό δικαιολογείται επιστημονικά.
54. Είναι απαραίτητο να αναλύονται οι μεταβολές σε κάθε σειρά πανομοιότυπων δειγμάτων με διαδικασίες ανάλυσης διασποράς ή πίνακα συνάφειας και να χρησιμοποιούνται κατάλληλες και επαρκείς μέθοδοι στατιστικής ανάλυσης με βάση αυτή την ανάλυση. Για την πολλαπλή σύγκριση των αποτελεσμάτων στις επιμέρους συγκεντρώσεις με τα αποτελέσματα από τους μάρτυρες, συνιστάται η διαδικασία αποκλιμάκωσης (step-down) (π.χ. ο έλεγχος Jonckheere-Terpstra) για συνεχείς αποκρίσεις. Όταν τα δεδομένα δεν είναι συμβατά με μονοτονική σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ο έλεγχος του Dunnett ή του Dunn (μετά από επαρκή μετασχηματισμό δεδομένων, εφόσον απαιτείται).
55. Για τη γεννητικότητα, πραγματοποιούνται καθημερινά μετρήσεις των αυγών οι οποίες μπορούν, ωστόσο, να αναλύονται ως συνολικές μετρήσεις αυγών ή ως επαναλαμβανόμενη μέτρηση. Στο προσάρτημα 10 παρέχονται αναλυτικές πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο ανάλυσης της εν λόγω παραμέτρου. Για τα ιστοπαθολογικά δεδομένα σε μορφή βαθμολογιών σοβαρότητας, έχει αναπτυχθεί ένας νέος στατιστικός έλεγχος, ο έλεγχος Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) (33).
56. Κάθε παρατηρούμενη παράμετρος στο πλαίσιο αγωγών με χημική ουσία η οποία παρουσιάζει σημαντική απόκλιση από τους κατάλληλους μάρτυρες θα πρέπει να αναφέρεται.

Θέματα ανάλυσης δεδομένων

Χρήση υπονομευμένων επιπέδων αγωγής

57. Προκειμένου να καθοριστεί εάν ένα πανομοιότυπο δείγμα ή μια ολόκληρη αγωγή παρουσιάζει έκδηλη τοξικότητα και θα πρέπει να εξαιρεθεί από την ανάλυση, εξετάζεται μια σειρά παραγόντων. Η έκδηλη τοξικότητα ορίζεται ως η εμφάνιση > 4 θανάτων σε οποιοδήποτε πανομοιότυπο δείγμα μεταξύ της 3ης εβδομάδας μετά τη γονιμοποίηση και της 9ης εβδομάδας μετά τη γονιμοποίηση, η οποία δεν μπορεί να αποδοθεί σε τεχνικό σφάλμα. Άλλες ενδείξεις έκδηλης τοξικότητας περιλαμβάνουν την αιμορραγία, μη φυσιολογικές συμπεριφορές, μη φυσιολογικούς τρόπους κολύμβησης, ανορεξία και άλλες κλινικές ενδείξεις ασθένειας. Για υποθανατηφόρες ενδείξεις τοξικότητας, ενδέχεται να χρειάζονται ποιοτικές αξιολογήσεις, οι οποίες θα πρέπει πάντα να πραγματοποιούνται σε συνάρτηση με την ομάδα-μάρτυρα νερού αραίωσης (μόνο καθαρό νερό). Εάν είναι εμφανής έκδηλη τοξικότητα στις αγωγές με την υψηλότερη δόση, συνιστάται να λογοκρίνονται οι αγωγές αυτές από την ανάλυση.

Μάρτυρες με διαλύτη

58. Το ενδεχόμενο χρήσης διαλύτη θα πρέπει να εξετάζεται μόνο ως έσχατη λύση, αφού έχει εξεταστεί το ενδεχόμενο χρήσης όλων των άλλων επιλογών χορήγησης χημικών ουσιών. Εάν χρησιμοποιείται διαλύτης, θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με έναν μάρτυρα νερού αραίωσης. Στο τέλος της δοκιμής, θα πρέπει να αξιολογούνται οι πιθανές επιδράσεις του διαλύτη. Αυτό πραγματοποιείται μέσω στατιστικής σύγκρισης της ομάδας-μάρτυρα με διαλύτη και της ομάδας-μάρτυρα νερού αραίωσης. Οι πλέον κατάλληλες παράμετροι προς εξέταση στην ανάλυση αυτή είναι οι παράγοντες της σωματικής αύξησης (βάρους), καθώς αυτές επηρεάζονται από τυχόν γενικευμένη τοξικότητα. Σε περίπτωση εντοπισμού στατιστικά σημαντικών διαφορών στις παραμέτρους αυτές μεταξύ των ομάδων μάρτυρα νερού αραίωσης και μάρτυρα με διαλύτη, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η βέλτιστη κρίση ειδικών προκειμένου να προσδιοριστεί το κατά πόσον υπονομεύεται η εγκυρότητα της δοκιμής. Εάν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων, οι αγωγές με την υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να συγκρίνονται με τον μάρτυρα με διαλύτη, εκτός εάν είναι γνωστό ότι προτιμάται η σύγκριση με τον μάρτυρα νερού αραίωσης. Εάν δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων μάρτυρα, συνιστάται οι αγωγές με την υπό δοκιμή χημική ουσία να συγκρίνονται με τις συγχωνευμένες ομάδες (ομάδες μάρτυρα με διαλύτη και μάρτυρα νερού αραίωσης), εκτός εάν είναι γνωστό ότι προτιμάται η σύγκριση είτε μόνο με την ομάδα μάρτυρα νερού αραίωσης είτε μόνο με την ομάδα μάρτυρα με διαλύτη.

Έκθεση δοκιμής

59. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία: φυσική μορφή και, εφόσον έχουν σημασία, φυσικοχημικές ιδιότητες,

- στοιχεία ταυτότητας της χημικής ουσίας,

Μονοσυστατική ουσία:

- φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,
- ταυτοποίηση της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ. (περιλαμβανομένης της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα, κατά περίπτωση).

Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:

- περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Είδος δοκιμής:

- επιστημονική ονομασία, φυλή εάν είναι γνωστή, προέλευση και μέθοδος συλλογής των γονιμοποιημένων αυγών και μετέπειτα χειρισμός.

Συνθήκες δοκιμής:

- φωτοπερίοδος/-οι,
- σχεδιασμός δοκιμής (π.χ. μέγεθος θαλάμου, υλικό και όγκος νερού, αριθμός θαλάμων δοκιμής και πανομοιότυπων δειγμάτων, αριθμός ιχθυδίων ανά πανομοιότυπο δείγμα),
- μέθοδος παρασκευής των αποθεματικών διαλυμάτων και συχνότητα ανανέωσης (θα πρέπει να αναφέρονται το μέσο διαλυτοποίησης και η συγκέντρωσή του, εφόσον χρησιμοποιείται),
- μέθοδος χορήγησης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. αντλίες, συστήματα αραίωσης),
- η απόδοση ανάκτησης της μεθόδου και οι ονομαστικές συγκεντρώσεις της δοκιμής, το όριο ποσοτικού προσδιορισμού, ο μέσος όρος των μετρούμενων τιμών και οι τυπικές αποκλίσεις τους στα δοκιμαστικά δοχεία και η μέθοδος με την οποία επιτεύχθηκαν, καθώς και στοιχεία που αποδεικνύουν ότι οι μετρήσεις αναφέρονται στις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε αληθές διάλυμα,
- χαρακτηριστικά του νερού αραίωσης: pH, σκληρότητα, θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, επίπεδα υπολειμματικού χλωρίου (εφόσον μετρούνται), ολικός οργανικός άνθρακας (εφόσον μετρείται), αιωρούμενα στερεά (εφόσον μετρούνται), αλατότητα του δοκιμαστικού μέσου (εφόσον μετρείται) και τυχόν άλλες μετρήσεις,
- οι ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, οι μέσοι όροι των μετρούμενων τιμών και οι τυπικές αποκλίσεις τους,

- ποιότητα του νερού μέσα στα δοκιμαστικά δοχεία, pH, θερμοκρασία (καθημερινά) και συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου,
- λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη σίτιση (π.χ. είδος τροφής, πηγή, ποσότητα και συχνότητα χορήγησης).

Αποτελέσματα:

- ενδείξεις που αποδεικνύουν ότι οι μάρτυρες πληρούν τα συνολικά κριτήρια επικύρωσης:
 - δεδομένα για τον μάρτυρα (και για τον μάρτυρα με διαλύτη, όταν χρησιμοποιείται) και τις ομάδες αγωγής ως εξής: εκκόλαψη (εκκολαψιμότητα και χρόνος μέχρι την εκκόλαψη) για τις γενεές F1 και F2, επιβίωση μετά την εκκόλαψη για τη γενεά F1, σωματική αύξηση (μήκος και σωματικό βάρος) για τη γενεά F1, γονοτυπικό φύλο και σεξουαλική διαφοροποίηση (π.χ. δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου βάσει ιστολογικής εξέτασης των θηλοειδών αποφύσεων του εδρικού πτερυγίου και των γονάδων) για τη γενεά F1, φαινοτυπικό φύλο για τη γενεά F1, δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου (θηλοειδείς αποφύσεις εδρικού πτερυγίου) για τη γενεά F1, *vtg* mRNA (ή πρωτεΐνη VTG) για τη γενεά F1, αξιολόγηση της ιστοπαθολογικής εικόνας (γονάδα, ήπαρ και νεφρός) για τη γενεά F1 και αναπαραγωγή (γεννητικότητα και γονιμότητα) για τις γενεές F0, F1, (βλ. πίνακες 1 και 2),
 - προσέγγιση για τη στατιστική ανάλυση (ανάλυση παλινδρόμησης ή ανάλυση διασποράς) και την επεξεργασία των δεδομένων (στατιστικοί έλεγχοι ή στατιστικά μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν),
 - συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) για κάθε απόκριση που αξιολογήθηκε,
 - κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιπτώσεις (LOEC) για κάθε απόκριση που αξιολογήθηκε (σε $p = 0,05$), EC_x για κάθε απόκριση που αξιολογήθηκε, κατά περίπτωση, και διαστήματα εμπιστοσύνης (π.χ. 90 % ή 95 %), καθώς και γραφική παράσταση του προσαρμοσμένου μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της, κλίση της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης, μαθηματικός τύπος του μοντέλου παλινδρόμησης, εκτιμώμενες παράμετροι του μοντέλου και τα τυπικά σφάλματά τους,
 - οποιαδήποτε απόκλιση από την εν λόγω μέθοδο δοκιμών και οι αποκλίσεις από τα κριτήρια αποδοχής, και εκτιμήσεις των δυνητικών επιπτώσεων στην έκβαση της δοκιμής.
60. Για τα αποτελέσματα των μετρήσεων παραμέτρων, θα πρέπει να παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις τους (ει δυνατόν, τόσο βάσει των πανομοιότυπων δειγμάτων όσο και βάσει των συγκεντρώσεων).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (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 and 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 and 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 and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2552-2560.
- (6) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and 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 and 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 and 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 and 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 and 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 and 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. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>.
- (13) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. *Chemosphere* 86: 593-599.
- (14) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (15) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and 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 and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
- (17) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and 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 and Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.
- (19) Gormley K and 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) Κεφάλαιο Γ.15 του παρόντος παραρτήματος: ψάρια, δοκιμασία βραχυπρόθεσμης τοξικότητας στα έμβρυα και τα λεκιθοφόρα ιχθύδια.

- (21) Κεφάλαιο Γ.37 του παρόντος παραρτήματος, Δοκιμασία 21 ημερών σε ψάρια: Μία βραχυπρόθεσμη δοκιμή διαλογής για την οιστρογονική και ανδρογονική δράση, και την αναστολή αρωματάσης.
- (22) Κεφάλαιο Γ.41 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή σεξουαλικής ανάπτυξης ψαριών.
- (23) Κεφάλαιο Γ.48 του παρόντος παραρτήματος: Βραχυπρόθεσμη δοκιμή αναπαραγωγής σε ψάρια.
- (24) Κεφάλαιο Γ.47 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή τοξικότητας στα αρχικά στάδια ζωής των ψαριών.
- (25) Κεφάλαιο Γ.49 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή οξείας τοξικότητας σε έμβρυα ψαριών (FET).
- (26) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and 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 and 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 and Scharrtl 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 and 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 and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108-1116.

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Δοκιμή ELISA: ενζυμική δοκιμή ανοσοπροσρόφησης

Γεννητικότητα = αριθμός αυγών

Γονιμότητα = αριθμός βιώσιμων αυγών/γεννητικότητα

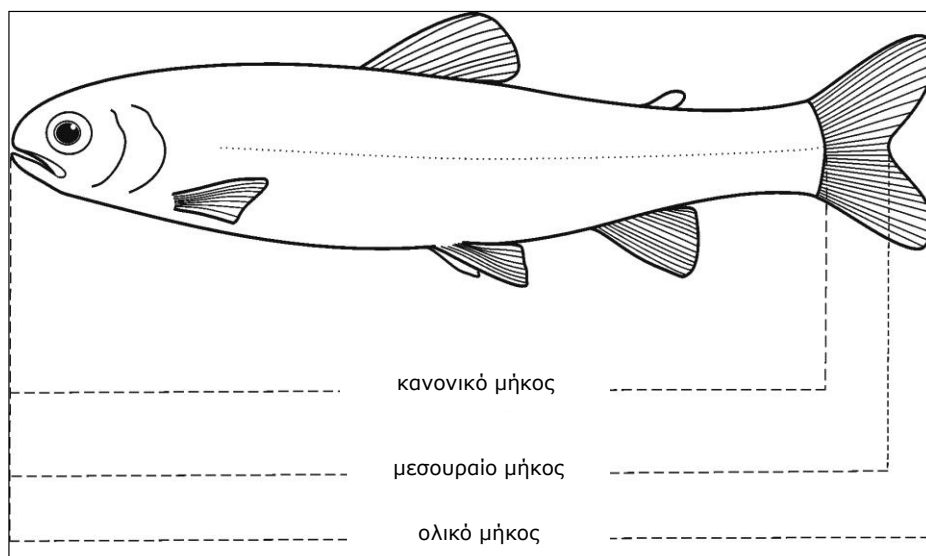
Μεσουραίο μήκος (FL): αναφέρεται στο μήκος από την άκρη του ρύγχους έως το άκρο των μεσαίων ακτίνων του ουραίου πτερυγίου και χρησιμοποιείται σε ψάρια στα οποία είναι δύσκολο να εντοπιστεί η κατάληξη της σπονδυλικής στήλης (www.fishbase.org)

Εκκολαψιμότητα = εκκολάψεις/αριθμό εμβρύων που φορτώνονται στον επωαστήρα

IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee (Θεσμική Επιτροπή Φροντίδας και Χρησιμοποίησης Ζώων)

Κανονικό μήκος (SL): αναφέρεται στο μήκος ψαριού που μετράται από την άκρη του ρύγχους έως το οπίσθιο άκρο του τελευταίου σπονδύλου ή το οπίσθιο άκρο του μεσοπλάγιου τμήματος της υποουράιας πλάκας. Με απλά λόγια, η μέτρηση αυτή δεν περιλαμβάνει το μήκος του ουραίου πτερυγίου (www.fishbase.org)

Ολικό μήκος (TL): αναφέρεται στο μήκος από την άκρη του ρύγχους έως την άκρη του μακρύτερου λοβού του ουραίου πτερυγίου, που συνήθως μετράται με τους λοβούς συμπιεσμένους κατά μήκος του άξονα συμμετρίας. Πρόκειται για μέτρηση ευθείας γραμμής που δεν ακολουθεί την καμπύλη του σώματος (www.fishbase.org)



Σχήμα 1: Περιγραφή των διαφορετικών χρησιμοποιούμενων μηκών

ECx: (Συγκέντρωση επίδρασης για επίδραση x %): η συγκέντρωση που προκαλεί x % επίδρασης σε υπό δοκιμή οργανισμούς εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με μάρτυρα. Για παράδειγμα, η EC50 είναι η συγκέντρωση που εκτιμάται ότι προκαλεί επίδραση σε τελικό σημείο δοκιμής σε ποσοστό 50% του εκτιθέμενου πληθυσμού επί καθορισμένη περίοδο έκθεσης.

Δοκιμή συνεχούς ροής = δοκιμή με συνεχή ροή των διαλυμάτων δοκιμής διαμέσου του συστήματος δοκιμής κατά τη διάρκεια της έκθεσης.

Άξονας HPG: άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων.

IUPAC: Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας.

Δείκτης πληθυσμιακού φόρτου: το νωπό βάρος ψαριών κατ' όγκο νερού.

Κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιπτώσεις (LOEC) είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία παρατηρείται ότι η εν λόγω ουσία έχει στατιστικά σημαντική επίδραση (με $p < 0,05$), συγκριτικά με τον μάρτυρα. Ωστόσο, όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής που υπερβαίνουν τη LOEC αναμένεται να έχουν βλαβερή επίδραση ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται στη LOEC. Σε περίπτωση που δεν είναι δυνατόν να πληρούνται οι δύο αυτοί όροι, θα πρέπει να εξηγείται πλήρως ο τρόπος επιλογής της LOEC (και, κατ' επέκταση, της NOEC). Τα προσαρτήματα 5 και 6 παρέχουν οδηγίες.

Μέση θανατηφόρος συγκέντρωση (LC50): η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που εκτιμάται ότι είναι θανατηφόρος για το 50% των υπό δοκιμή οργανισμών κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) είναι η αμέσως χαμηλότερη της LOEC συγκέντρωση της δοκιμής, η οποία, συγκριτικά με τον μάρτυρα, δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση (με $p < 0,05$) εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης.

SMILES: (Simplified Molecular Input Line Entry Specification) προδιαγραφή απλοποιημένης μοριακής γραμμικής γραφής.

Πυκνότητα πληθυσμού: ο αριθμός ψαριών κατ' όγκο νερού.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

UVCB: ουσίες άγνωστης ή μεταβλητής σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

VTG: η λεκιθογενίνη είναι φωσφολιπογλυκοπρωτεΐνη που αποτελεί πρόδρομη ένωση των πρωτεϊνών της λεκίθου του αυγού και συναντάται κανονικά σε σεξουαλικά ενεργά θηλυκά

άτομα όλων των ωοτόκων ειδών.

WPF: εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση

Προσάρτημα 2**ΟΡΙΣΜΕΝΑ ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΟΣ ΑΠΟΔΕΚΤΟΥ ΥΔΑΤΟΣ ΑΡΑΙΩΣΗΣ**

Ουσία	Οριακή συγκέντρωση
Σωματίδια	5 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	2 mg/l
Μη ιοντισμένη αμμωνία	1 µg/l
Υπολείμματα χλωρίου	10 µg/l
Ολικά οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα	50 ng/l
Ολικά οργανοχλωριούχα γεωργικά φάρμακα συν πολυχλωριωμένα διφαινύλια	50 ng/l
Ολικό οργανικό χλώριο	25 ng/l
Αργίλιο	1 µg/l
Αρσενικό	1 µg/l
Χρώμιο	1 µg/l
Κοβάλτιο	1 µg/l
Χαλκός	1 µg/l
Σίδηρος	1 µg/l
Μόλυβδος	1 µg/l
Νικέλιο	1 µg/l
Ψευδάργυρος	1 µg/l
Κάδμιο	100 ng/l
Υδράργυρος	100 ng/l
Αργυρος	100 ng/l

Προσάρτημα 3**ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΟΚΙΜΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΟΓΡΤ**

- | | |
|---|---|
| 1. Συνιστώμενο είδος | Ρυζόψαρο (<i>Oryzias latipes</i>) |
| 2. Τύπος δοκιμής | Συνεχής ροή |
| 3. Θερμοκρασία νερού | Η ονομαστική θερμοκρασία δοκιμής είναι 25°C. Η μέση θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της δοκιμής σε κάθε δεξαμενή είναι 24-26 °C. |
| 4. Ποιότητα φωτισμού | Λαμπτήρες φθορισμού (ευρέος φάσματος και ~150 lumen/m ²) (~150 lux).

16 ώρες φως, 8 ώρες σκοτάδι |
| 6. Δείκτης πληθυσμιακού φόρτου | F0: 2 ενήλικα/πανομοιότυπο δείγμα· F1: κατά την έναρξη, 20 αυγά (έμβρυα)/πανομοιότυπο δείγμα κατ' ανώτατο όριο, που μειώνονται σε 12 έμβρυα/πανομοιότυπο δείγμα κατά την εκκόλαψη, κατόπιν 2 ενήλικα (ζεύγος αναπαραγωγής XX-XY) στις 9-10 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση για το αναπαραγωγικό στάδιο |
| 7. Ελάχιστος ωφέλιμος όγκος θαλάμου δοκιμής | 1,8 l (π.χ. μέγεθος θαλάμου 18x9x15 cm) |
| 8. Ανανεώσεις του όγκου των διαλυμάτων δοκιμής | Τουλάχιστον 5 ανανεώσεις όγκου/ημέρα έως και 16 ανανεώσεις όγκου/ημέρα (ή ροή 20 ml/λεπτό) |
| 9. Ηλικία των υπό δοκιμή οργανισμών κατά την έναρξη | F0: > 12 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση, αλλά συνιστάται να μην υπερβαίνουν οι 16 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση |
| 10. Αριθμός οργανισμών ανά πανομοιότυπο δείγμα | F0: 2 ψάρια (ζεύγος αρσενικού και θηλυκού)· F1: 20 ψάρια (αυγά)/πανομοιότυπο δείγμα κατ' ανώτατο όριο (παράγόμενα από ζεύγη αναπαραγωγής F0 και F1). |
| 11. Αριθμός αγωγών | 5 αγωγές με υπό δοκιμή χημική ουσία συν κατάλληλοι μάρτυρες |
| 12. Αριθμός πανομοιότυπων δειγμάτων ανά αγωγή | Τουλάχιστον 6 πανομοιότυπα δείγματα ανά αγωγή για υπό δοκιμή χημική ουσία και τουλάχιστον 12 πανομοιότυπα δείγματα για μάρτυρα και μάρτυρα με διαλύτη, αν χρησιμοποιείται (ο αριθμός των πανομοιότυπων δειγμάτων διπλασιάζεται στην αναπαραγωγική φάση στην F1) |
| 13. Αριθμός οργανισμών ανά δοκιμή | Τουλάχιστον 84 ψάρια στην F0 και 504 στην F1. (Εάν χρησιμοποιείται μάρτυρας με διαλύτη, 108 ψάρια στην F0 και 648 ψάρια στην F1). Ως μονάδα μέτρησης λαμβάνεται το στάδιο μετά το λεκιθοφόρο ιχθύδιο. |
| 14. Πρόγραμμα σίτισης | Τα ψάρια τρέφονται με γαρίδες άλμης <i>Artemia</i> spp. (ναύπλιοι ηλικίας 24 ωρών) κατά βούληση και, εφόσον χρειαστεί, παρέχεται συμπλήρωμα |

τροφής του εμπορίου σε νιφάδες (παράδειγμα προγράμματος σίτισης για την εξασφάλιση κατάλληλης ανάπτυξης και σωματικής αύξησης που υποστηρίζει την εύρωστη αναπαραγωγή παρατίθεται στο προσάρτημα 6).

- | | |
|--|--|
| 15. Αερισμός | Κανένας, εκτός εάν το διαλυμένο οξυγόνο φθάσει $< 60 \%$ της τιμής κορεσμού με αέρα |
| 16. Νερό αραίωσης | Καθαρό νερό από επιφανειακά ύδατα, γεώτρηση ή ανασύσταση ή αποχλωριωμένο νερό βρύσης. |
| 17. Περίοδος έκθεσης | Επί το πλείστον 19 εβδομάδες (από F0 έως εκκόλαψη F2) |
| 18. Βιολογικά τελικά σημεία (πρωτεύοντα) | Εκκολαψιμότητα (F1 και F2)· επιβίωση [F1, από εκκόλαψη έως 4 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση (τέλος προνυμφικού σταδίου/έναρξη νεαρού σταδίου), από 4 έως 9 (ή 10) εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση (έναρξη νεαρού σταδίου έως υποενηλικίωση) και από 9 έως 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση (υποενηλικίωση έως λήξη ενήλικου σταδίου)]· σωματική αύξηση (F1, μήκος και βάρος στις 9 και 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)· δευτερεύοντα χαρακτηριστικά φύλου (F1, θηλές εδρικού πτερυγίου στις 9 και 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)· λεκιθογενίνη (F1, <i>vtg</i> mRNA ή πρωτεΐνη VTG στις 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)· φαινοτυπικό φύλο (F1, μέσω ιστολογικής εξέτασης των γονάδων στις 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση)· αναπαραγωγή (F0 και F1, γεννητικότητα και γονιμότητα επί 21 ημέρες)· χρόνος ωοτοκίας (F1)· και ιστοπαθολογία (F1, γονάδες, ήπαρ και νεφρός στις 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση) |
| 19. Κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής | Διαλυμένο οξυγόνο $\geq 60\%$ της τιμής κορεσμού με αέρα· μέση θερμοκρασία νερού $24-26^{\circ}\text{C}$ καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής· επιτυχής αναπαραγωγή $\geq 65\%$ των θηλυκών μαρτύρων· μέση ημερήσια γεννητικότητα ≥ 20 των αυγών των μαρτύρων· Εκκολαψιμότητα $\geq 80 \%$ (κατά μέσο όρο) των μαρτύρων (σε καθεμία από τις F1 και F2)· επιβίωση μετά την εκκόλαψη έως 3 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση $\geq 80 \%$ (μέσος όρος) και από 3 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση έως τη θανάτωση της γενεάς $\geq 90\%$ (μέσος όρος) των μαρτύρων (F1), οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα θα πρέπει να διατηρούνται σε ικανοποιητικό επίπεδο εντός $\pm 20\%$ των μέσων μετρούμενων τιμών. |

Προσάρτημα 4

ΟΔΗΓΙΕΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΙΣ ΣΥΝΗΘΕΙΣ ΤΙΜΕΣ ΜΑΡΤΥΡΩΝ

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι αυτές οι τιμές μαρτύρων βασίζονται σε περιορισμένο αριθμό μελετών επικύρωσης και ενδέχεται να τροποποιηθούν ενόψει περαιτέρω εμπειρίας.

Σωματική αύξηση

Λαμβάνονται μετρήσεις βάρους και μήκους για όλα τα άτομα της δειγματοληψίας στις 9 (ή 10) και στις 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση (wpf). Με αυτό το πρωτόκολλο, το προσδοκώμενο υγρό βάρος στις 9 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση είναι 85-145 mg για τα αρσενικά και 95-150 mg για τα θηλυκά. Το προσδοκώμενο βάρος στις 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση είναι 250-330 mg για τα αρσενικά και 280-350 mg για τα θηλυκά. Παρότι ενδέχεται να υπάρχουν αποκλίσεις από αυτές τις τιμές σε μεμονωμένα άτομα, εάν το μέσο βάρος των μαρτύρων αποκλίνει σημαντικά από αυτές τις κλίμακες τιμών, ιδίως το κατώτερο όριο, τότε ενδέχεται να υπάρχουν προβλήματα σίτισης, ελέγχου της θερμοκρασίας, ποιότητας του νερού, ασθένειας ή συνδυασμός αυτών των παραγόντων.

Εκκόλαψη

Η επιτυχία εκκόλαψης των μαρτύρων κυμαίνεται συνήθως στο 90%, εντούτοις δεν είναι σπάνιες τιμές που περιορίζονται στο 80%. Επιτυχία εκκόλαψης κάτω του 75% μπορεί να υποδηλώνει ανεπαρκή ανακίνηση των αναπτυσσόμενων αυγών ή ακατάλληλη φροντίδα στον χειρισμό των αυγών, όπως απουσία έγκαιρης απομάκρυνσης των νεκρών αυγών που οδηγεί σε προσβολή από μύκητες.

Επιβίωση

Τα ποσοστά επιβίωσης από την εκκόλαψη έως 3 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση και μετά τις 3 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση είναι συνήθως 90% ή υψηλότερα για τους μάρτυρες, αλλά αν τα ποσοστά επιβίωσης στα πρώιμα στάδια της ζωής μειώνονται σε επίπεδο έως και 80% των μαρτύρων δεν θεωρούνται ανησυχητικά. Ποσοστά επιβίωσης των μαρτύρων κάτω του 80% θα πρέπει να προκαλέσουν ανησυχία και ενδέχεται να υποδηλώνουν ανεπαρκή καθαρισμό των ενυδρείων που οδηγεί σε απώλεια ατόμων σε προνυμφικό στάδιο λόγω ασθένειας ή εξαιτίας ασφυξίας που οφείλεται σε χαμηλά επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου. Η θνησιμότητα μπορεί επίσης να οφείλεται σε τραυματισμούς κατά τον καθορισμό της δεξαμενής και σε απώλειες ψαριών σε προνυμφικό στάδιο στο σύστημα αποστράγγισης της δεξαμενής.

Γονίδιο λεκιθογενίνης

Παρότι σε απόλυτα επίπεδα το γονίδιο της λεκιθογενίνης (*vtg*), εκφρασμένο ως αντίγραφα/ng ολικού mRNA, ενδέχεται να παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ εργαστηρίων λόγω των διαδικασιών ή του συστήματος οργάνων που χρησιμοποιούνται, η αναλογία *vtg* θα πρέπει να είναι περίπου 200 φορές μεγαλύτερη στους θηλυκούς μάρτυρες

σε σύγκριση με τους αρσενικούς μάρτυρες. Εντούτοις, δεν είναι σπάνιο η αναλογία αυτή να ανέρχεται σε τιμές 1.000 έως 2.000, ενώ αναλογίες κάτω του 200 είναι ύποπτες και ενδέχεται να υποδηλώνουν προβλήματα μόλυνσης του δείγματος ή προβλήματα στην διαδικασία και/ή στα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται.

Δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του φύλου

Στα αρσενικά, το κανονικό εύρος δευτερευόντων χαρακτηριστικών του φύλου, που ορίζονται ως ο συνολικός αριθμός των τμημάτων των ακτίνων των θηλών του εδρικού πτερυγίου, είναι 40-80 στις 9-10 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση. Στις 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση, ο αριθμός στους αρσενικούς μάρτυρες θα πρέπει να είναι περίπου 80-120 και στους θηλυκούς μάρτυρες 0. Για λόγους που παραμένουν ανεξήγητοι, σε σπάνιες περιπτώσεις ορισμένα αρσενικά δεν εμφανίζουν θηλές πριν από τις 9 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση, αλλά δεδομένου ότι όλοι οι αρσενικοί μάρτυρες αναπτύσσουν θηλές έως τις 15 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση, αυτό οφείλεται πιθανότατα σε καθυστερημένη ανάπτυξη. Η παρουσία θηλών σε θηλυκούς μάρτυρες υποδεικνύει την παρουσία αρσενικών XX στον πληθυσμό.

Αρσενικά XX

Η κανονική συχνότητα εμφάνισης αρσενικών XX στην καλλιέργεια είναι περίπου 4 % ή λιγότερο στους 25 °C, ενώ παρατηρείται αυξημένη συχνότητα με την αύξηση της θερμοκρασίας. Θα πρέπει να ληφθούν μέτρα για την ελαχιστοποίηση της αναλογίας των αρσενικών XX στον πληθυσμό. Δεδομένου ότι η συχνότητα εμφάνισης αρσενικών XX οφείλεται μάλλον σε γενετικό παράγοντα και συνεπώς είναι κληρονομήσιμη, αποτελεσματικό μέσο μείωσης της εμφάνισης αρσενικών XX στον πληθυσμό είναι η παρακολούθηση του αποθέματος της καλλιέργειας και η αποφυγή χρήσης αρσενικών XX για τον πολλαπλασιασμό του.

Δραστηριότητα ωοτοκίας

Η δραστηριότητα ωοτοκίας στα πανομοιότυπα δείγματα-μάρτυρες θα πρέπει να παρακολουθείται καθημερινά πριν από τη διενέργεια αξιολόγησης της γεννητικότητας. Τα ζεύγη μαρτύρων μπορούν να αξιολογηθούν σε ποιοτικό επίπεδο οπτικά για τον εντοπισμό στοιχείων που υποδηλώνουν δραστηριότητα ωοτοκίας. Έως τις 12-14 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση θα πρέπει να παρατηρηθεί ωοτοκία στα περισσότερα ζεύγη μαρτύρων. Μικρός αριθμός ζευγών αναπαραγωγής κατά την περίοδο αυτή υποδηλώνει ενδεχόμενα προβλήματα υγείας, ωριμότητας ή ευζωίας των ψαριών.

Γεννητικότητα

Στα υγιή ρυζόψαρα ηλικίας 12-14 εβδομάδων μετά τη γονιμοποίηση, που σιτίζονται σωστά, η ωοτοκία είναι συνήθως καθημερινή, με παραγωγή που κυμαίνεται από 15 έως 50 αυγά ανά ημέρα. Η παραγωγή αυγών στα 16 από τα προτεινόμενα 24 ζεύγη αναπαραγωγής μαρτύρων (> 65 %) θα πρέπει να υπερβαίνει τα 20 αυγά ανά ημέρα και μπορεί να φθάσει τα 40 αυγά ανά ημέρα. Χαμηλότερη ποσότητα μπορεί να υποδηλώνει ανώριμα, υποσιτιζόμενα

ή μη υγιή αναπαραγωγικά ζεύγη.

Γονιμότητα

Το ποσοστό γόνιμων αυγών στα αναπαραγωγικά ζεύγη μαρτύρων είναι κατά κανόνα της τάξης του 90 %, ενώ δεν είναι σπάνιες οι τιμές άνω του 90 %. Ποσοστά γονιμότητας κάτω του 80 % των αυγών των μαρτύρων είναι ύποπτα και μπορεί να υποδηλώνουν την ύπαρξη μη υγιών ατόμων ή μη ιδανικών συνθηκών καλλιέργειας.

Προσάρτημα 5

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΣΙΤΙΣΗΣ

Στον πίνακα 1 δίνεται ένα παράδειγμα προγράμματος σίτισης για την εξασφάλιση σωστής ανάπτυξης και σωματικής αύξησης που υποστηρίζει την εύρωστη αναπαραγωγή. Οι αποκλίσεις από αυτό το πρόγραμμα σίτισης είναι αποδεκτές, αλλά συνιστάται η δοκιμή τους για να εξακριβωθεί ότι παρατηρείται αποδεκτό επίπεδο σωματικής αύξησης και αναπαραγωγής. Προκειμένου να ακολουθηθεί το προτεινόμενο πρόγραμμα σίτισης, θα πρέπει πριν από την έναρξη της δοκιμής να προσδιοριστεί το ξηρό βάρος γαρίδων άλμης ανά όγκο πολτού γαρίδων άλμης. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με ζύγιση ενός προσδιορισμένου όγκου πολτού γαρίδων άλμης ο οποίος ξηρανθεί επί 24 ώρες σε 60 °C σε προζυγισμένα σκεύη. Για να προσμετρηθεί το βάρος του άλατος στον πολτό, θα πρέπει να ξηρανθεί αντίστοιχος όγκος του διαλύματος άλατος που χρησιμοποιήθηκε στον πολτό. Εναλλακτικά, οι γαρίδες άλμης μπορούν να περάσουν από διήθηση και έκπλυση με απεσταγμένο νερό πριν από την ξήρανση, ώστε να μη χρειάζεται να μετρηθεί το βάρος του «τυφλού διαλύματος άλατος». Τα στοιχεία αυτά χρησιμοποιούνται για τη μετατροπή των στοιχείων του πίνακα από ξηρό βάρος γαρίδων άλμης σε όγκο πολτού γαρίδων άλμης που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για τη σίτιση ανά άτομο. Επιπλέον, συνιστάται οι κατάλληλες δόσεις πολτού γαρίδων άλμης να ζυγίζονται σε εβδομαδιαία βάση, ώστε να επαληθεύεται ότι χορηγείται το σωστό ξηρό βάρος γαρίδων άλμης.

Πίνακας 1: Παράδειγμα προγράμματος σίτισης

Χρόνος (μετά την εκκόλαψη)	Γαρίδες άλμης (mg ξηρού βάρους/ψάρι/ημέρα)
1η ημέρα	0,5
2η ημέρα	0,5
3η ημέρα	0,6
4η ημέρα	0,7
5η ημέρα	0,8
6η ημέρα	1,0
7η ημέρα	1,3
8η ημέρα	1,7
9η ημέρα	2,2
10η ημέρα	2,8
11η ημέρα	3,5
12η ημέρα	4,2
13η ημέρα	4,5
14η ημέρα	4,8
15η ημέρα	5,2
16η-21η ημέρα	5,6
4η εβδομάδα	7,7
5η εβδομάδα	9,0
6η εβδομάδα	11,0
7η εβδομάδα	13,5
8η εβδομάδα-θανάτωση	22,5

Προσάρτημα 6

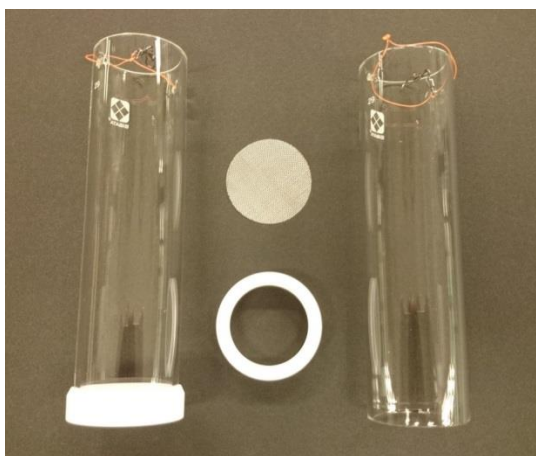
ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΘΑΛΑΜΟΥ ΕΠΩΑΣΗΣ ΑΥΓΩΝ

Παράδειγμα Α



Ο επωαστήρας αυτός αποτελείται από έναν γυάλινο σωλήνα φυγοκέντρου εγκάρσια τετμημένο, ο οποίος συνδέεται με θήκη από ανοξείδωτο χάλυβα και συγκρατείται στη θέση του από το κοχλιωτό πώμα φυγοκέντρησης. Ένα μικρός σωλήνας από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα προβάλλει διαμέσου του πώματος και τοποθετείται κοντά στον στρογγυλό πυθμένα, διοχετεύοντας αέρα με αργό ρυθμό ώστε να αιωρούνται τα αυγά και να μειώνεται η μετάδοση μολύνσεων από σαπροφυτικούς μύκητες μεταξύ των αυγών, ενώ παράλληλα διευκολύνεται η ανταλλαγή χημικών ουσιών μεταξύ του επωαστήρα και της δεξαμενής συγκράτησης.

Παράδειγμα Β



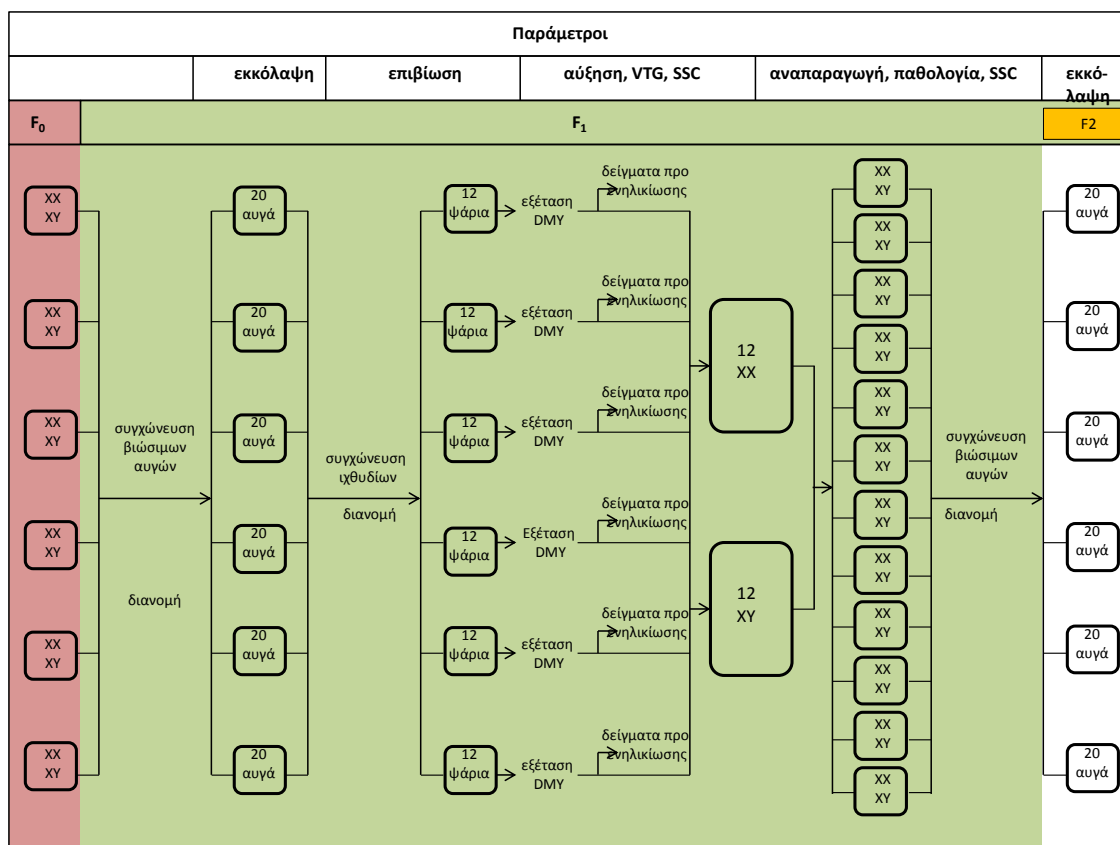


Ο επωαστήρας αυτός αποτελείται από ένα γυάλινο κυλινδρικό σώμα (διαμέτρου 5 cm και ύψους 10 cm) και συρματοπλέγμα από ανοξείδωτο χάλυβα (0,25 φ και μεγέθους ματιού 32), το οποίο προσδένεται στον πυθμένα του σώματος με έναν δακτύλιο PTFE. Οι επωαστήρες αναρτώνται από τη ράβδο ανύψωσης στις δεξαμενές και ανακινούνται κάθετα (πλάτος περίπου 5 cm) με περιοδικότητα κατάλληλη (περίπου ανά 4 δευτερόλεπτα) για τα αυγά ρυζόψαρου.

Προσάρτημα 7

ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΧΩΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΑΤΟΜΩΝ ΣΤΑ ΠΑΝΟΜΟΙΟΤΥΠΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΔΟΚΙΜΩΝ ΜΕΟΓΡΤ

Σχήμα 1: Συγχώνευση και επανασύσταση πανομοιότυπων δειγμάτων στη μέθοδο ΜΕΟΓΡΤ. Το σχήμα αναπαριστά μία αγωγή ή ½ του μάρτυρα. Λόγω της συγχώνευσης, τα πανομοιότυπα δείγματα δεν παραμένουν τα ίδια καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Να σημειωθεί ότι ο όρος «αυγά» αναφέρεται σε βιώσιμα γονιμοποιημένα αυγά (αντίστοιχα των εμβρύων).



Αγωγή και πανομοιότυπα δείγματα

Η μέθοδος δοκιμής συνιστά πέντε αγωγές με υπό δοκιμή χημική ουσία με χρήση υλικού τεχνικής καθαρότητας και ενός αρνητικού μάρτυρα. Ο αριθμός των πανομοιότυπων δειγμάτων ανά αγωγή δεν παραμένει σταθερός στη διάρκεια της ΜΕΟΓΡΤ και ο αριθμός των πανομοιότυπων δειγμάτων στην αγωγή με μάρτυρα είναι διπλάσιος σε σχέση με οποιαδήποτε αγωγή με υπό δοκιμή χημική ουσία. Στην F₀, κάθε αγωγή με υπό δοκιμή ουσία έχει έξι πανομοιότυπα δείγματα ενώ η αγωγή με αρνητικό μάρτυρα έχει 12 πανομοιότυπα δείγματα. Συνιστάται ιδιαίτερα η αποφυγή χρήσης διαλυτών και, εφόσον χρησιμοποιούνται, στην έκθεση ΜΕΟΓΡΤ θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται αιτιολόγηση αφενός της χρήσης του διαλύτη και, αφετέρου, της επιλογής του διαλύτη. Επίσης, εάν χρησιμοποιηθεί διαλύτης, απαιτούνται δύο τύποι μαρτύρων: α) μάρτυρας με διαλύτη και β)

αρνητικός μάρτυρας. Από τις δύο αυτές ομάδες μαρτύρων θα πρέπει έκαστη να αποτελείται από πλήρη σειρά πανομοιότυπων δειγμάτων σε όλα τα σημεία του χρονοδιαγράμματος MEOGRT. Στη διάρκεια της δοκιμής ανάπτυξης οργανισμών γενεάς F1 (και F2, έως την εκκόλαψη), αυτή η δομή πανομοιότυπων δειγμάτων παραμένει η ίδια. Εντούτοις, στο ενήλικο στάδιο, όταν διαμορφώνονται τα ζεύγη αναπαραγωγής F1, ο αριθμός πανομοιότυπων δειγμάτων ζευγών αναπαραγωγής ανά αγωγή ιδανικά διπλασιάζεται· έτσι θα υπάρχουν έως και 12 ζεύγη πανομοιότυπων δειγμάτων σε κάθε αγωγή με υπό δοκιμή χημική ουσία και 24 ζεύγη αντιγράφων στην ομάδα μαρτύρων (και άλλα 24 ζεύγη πανομοιότυπων δειγμάτων στον μάρτυρα με διαλύτη, εφόσον χρειαστεί). Ο καθορισμός της εκκόλαψης από έμβρυα που γεννήθηκαν από ζεύγη F1 γίνεται με την ίδια δομή αντιγράφων όπως και με τα έμβρυα που γεννήθηκαν από ζεύγη F0, πράγμα που σημαίνει ότι αρχικά θα υπάρχουν έξι πανομοιότυπα δείγματα ανά αγωγή με υπό δοκιμή χημική ουσία και 12 πανομοιότυπα δείγματα στις ομάδες μαρτύρων.

Προσάρτημα 8

ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΘΗΛΟΕΙΔΩΝ ΑΠΟΦΥΣΕΩΝ ΕΔΡΙΚΟΥ ΠΤΕΡΥΓΙΟΥ

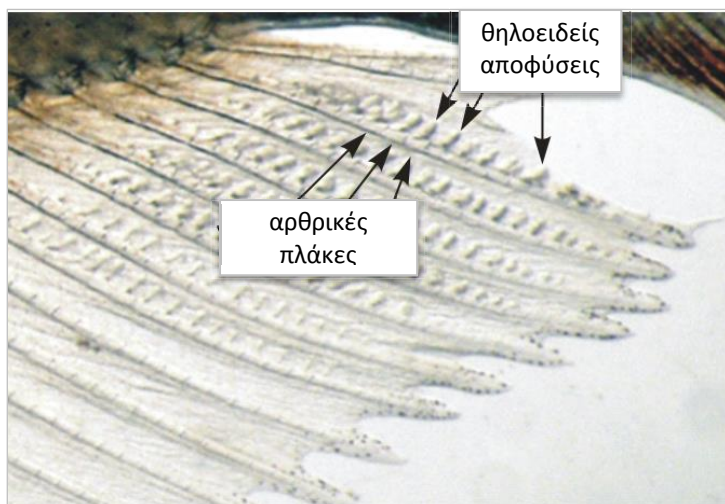
Βασικά υλικά και αντιδραστήρια

- Μικροσκόπιο ανατομής (προαιρετικά με συνδεδεμένη φωτογραφική μηχανή)
- Μέσο μονιμοποίησης [π.χ. Davidson (δεν συνιστάται το μέσο του Bouin)], σε περίπτωση που η μέτρηση δεν πραγματοποιείται από εικόνα

Διαδικασίες

Μετά τη νεκροψία/νεκροτομή, θα πρέπει να λαμβάνεται εικόνα του εδρικού πτερυγίου ώστε να διευκολύνεται η μέτρηση των θηλοειδών αποφύσεων εδρικού πτερυγίου. Παρότι η φωτογράφιση θεωρείται η συνιστώμενη μέθοδος, το εδρικό πτερύγιο μπορεί να μονιμοποιείται με μέσο μονιμοποίησης του Davidson ή άλλο κατάλληλο μέσο μονιμοποίησης επί περίπου 1 λεπτό. Είναι σημαντικό το εδρικό πτερύγιο να διατηρείται επίπεδο κατά τη μονιμοποίηση ώστε να διευκολύνεται η μέτρηση των θηλοειδών αποφύσεων. Μέχρι την ανάλυση, το πτώμα με το εδρικό πτερύγιο μπορούν να φυλάσσονται σε μέσο μονιμοποίησης του Davidson ή άλλο μέσο μονιμοποίησης. Μετράται ο αριθμός των αρθρικών πλακών (βλ. **σχήμα 1**) με τις θηλοειδείς αποφύσεις που προεξέχουν από την οπίσθια παρυφή της αρθρικής πλάκας.

Σχήμα 1: Θηλοειδείς αποφύσεις εδρικού πτερυγίου



Προσάρτημα 9

ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΜΕΟGRT

Εβδομάδες δοκιμής 1-3 (F0)

Τα ψάρια ωοτοκίας της γενεάς F0 που πληρούν τα κριτήρια επιλογής (βλ. παραγράφους 16-20) εκτίθενται επί τρεις εβδομάδες προκειμένου να καταστεί εφικτή η έκθεση των αναπτυσσόμενων γαμετών και γοναδικών ιστών στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Κάθε δεξαμενή πανομοιότυπων δειγμάτων στεγάζει ένα μεμονωμένο ζεύγος ψαριών αναπαραγωγής (ζεύγος αναπαραγωγής με θηλυκό XX και αρσενικό XY). Τα αυγά της ωοτοκίας συλλέγονται, μετρώνται και αξιολογούνται ως προς τη γονιμότητα επί 21 διαδοχικές ημέρες, με αφετηρία την ημέρα δοκιμής 1.

Εβδομάδα δοκιμής 4 (F0 και F1)

Συνιστάται τα γονιμοποιημένα και βιώσιμα αυγά (έμβρυα) να συλλέγονται σε μία μόνο ημέρα· εντούτοις, εάν δεν υπάρχουν αρκετά έμβρυα, τα έμβρυα μπορούν να συλλέγονται και δεύτερη ημέρα. Εάν συλλέγονται σε δύο ημέρες, όλα τα έμβρυα των αγωγών που συλλέχθηκαν την πρώτη ημέρα συγχωνεύονται με τα έμβρυα που συλλέχθηκαν τη δεύτερη ημέρα. Στη συνέχεια, το σύνολο των συγχωνευμένων εμβρύων για κάθε αγωγή κατανέμεται τυχαία σε καθένα από τους επωαστήρες πανομοιότυπων δειγμάτων, σε αναλογία 20 εμβρύων ανά επωαστήρα. Οι θνησιμότητες των γονιμοποιημένων αυγών (εμβρύων) ελέγχονται και καταγράφονται καθημερινά. Τα νεκρά αυγά απομακρύνονται από τους επωαστήρες (ο θάνατος γονιμοποιημένων αυγών, ιδίως κατά τα πρώιμα στάδια, διαπιστώνεται από τη σημαντική μείωση της διαύγειας και την αλλαγή του φυσικού χρωματισμού, τα οποία οφείλονται σε πήξη και/ή κατακρήμνιση πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα τα αυγά να αποκτούν λευκή, αδιαφανή εμφάνιση, ΟΟΣΑ 210).

Σημείωση: Σε περίπτωση που για μια μεμονωμένη αγωγή απαιτείται δεύτερη ημέρα συλλογής, η εν λόγω διαδικασία θα πρέπει να ακολουθείται για όλες τις αγωγές (περιλαμβανομένων των μαρτύρων). Εάν μετά τη δεύτερη ημέρα συλλογής οι αριθμοί των εμβρύων εξακολουθούν να μην αρκούν για την τοποθέτηση πληθυσμού 20 εμβρύων ανά επωαστήρα αγωγής, μειώστε τον αριθμό των εμβρύων που τοποθετούνται σε επωαστήρες σε 15 έμβρυα ανά επωαστήρα για τη συγκεκριμένη αγωγή. Εάν δεν υπάρχουν αρκετά έμβρυα ώστε να τοποθετηθούν 15 ανά επωαστήρα, μειώστε τον αριθμό των επωαστήρων πανομοιότυπων δειγμάτων μέχρις ότου ο αριθμός των εμβρύων να επαρκεί για την τοποθέτηση 15 εμβρύων ανά επωαστήρα. Επιπλέον, μπορούν να προστεθούν περισσότερα ζεύγη αναπαραγωγής και μάρτυρες ανά αγωγή στη γενεά F0 ώστε να παραχθούν περισσότερα αυγά προκειμένου να επιτευχθεί ο συνιστώμενος αριθμός των 20 αυγών ανά επωαστήρα.

Την 24η ημέρα δοκιμής, τα ζεύγη αναπαραγωγής της F0 θανατώνονται με ευθανασία, και καταγράφεται το βάρος και το μήκος τους. Εφόσον απαιτείται, τα ζεύγη αναπαραγωγής της F0 μπορούν να διατηρούνται επί 1-2 επιπλέον ημέρες προκειμένου να δημιουργηθεί νέα

γενεά F1.

Εβδομάδες δοκιμής 5-6 (F1)

Μία ή δύο ημέρες πριν από την αναμενόμενη έναρξη της εκκόλαψης, σταματήστε ή μειώστε την ανάδευση των επωαζόμενων αυγών προκειμένου να επισπεύσετε την εκκόλαψη. Καθώς τα έμβρυα εκκολάπτονται κάθε ημέρα, τα ιχθύδια συγχωνεύονται ανά αγωγή και κατανέμονται συστηματικά σε κάθε δεξαμενή προνυμφών πανομοιότυπων δειγμάτων εντός κάθε ορισμένης αγωγής, έως τον αριθμό των 12 ιχθυδίων. Αυτό γίνεται με τυχαία επιλογή ιχθυδίων και τοποθέτηση ενός μεμονωμένου ιχθυδίου τη φορά σε διαδοχικά πανομοιότυπα δείγματα, αδιακρίτως, κατά σειρά στα επιμέρους πανομοιότυπα δείγματα αγωγής μέχρις ότου όλα τα πανομοιότυπα δείγματα της αγωγής να περιλαμβάνουν 12 ιχθύδια. Εάν δεν υπάρχουν αρκετά ιχθύδια ώστε να συμπληρωθούν όλα τα πανομοιότυπα δείγματα, φροντίστε ώστε όσο το δυνατόν περισσότερα δείγματα να περιλαμβάνουν 12 ιχθύδια προκειμένου να ξεκινήσει η φάση της γενεάς F1.

Τα αυγά που δεν έχουν εκκολαφθεί σε χρονικό διάστημα διπλάσιο του διάμεσου αριθμού ημερών εκκόλαψης στον μάρτυρα θεωρούνται μη βιώσιμα και απορρίπτονται. Ο αριθμός των ιχθυδίων καταγράφεται και υπολογίζεται η επιτυχής εκκόλαψη (εκκολαψιμότητα) σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα.

Εβδομάδες δοκιμής 7-11 (F1)

Η επιβίωση των προνυμφών ελέγχεται και καταγράφεται καθημερινά σε όλα τα πανομοιότυπα δείγματα. Την 43η ημέρα δοκιμής, καταγράφεται ο αριθμός των επιβιωσάντων ψαριών σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα, καθώς και ο αρχικός αριθμός των ιχθυδίων που είχαν τοποθετηθεί (κανονικά δώδεκα). Κατ' αυτόν τον τρόπο, επιτρέπεται ο υπολογισμός της ποσοστιαίας επιβίωσης από το στάδιο της εκκόλαψης έως το στάδιο του ατόμου πριν την ενηλικίωση.

Εβδομάδες δοκιμής (F1)

Την ημέρα δοκιμής 78-85 λαμβάνεται μικρό δείγμα από το ουραίο πτερύγιο κάθε ψαριού προκειμένου να προσδιοριστεί το γονοτυπικό φύλο του ατόμου (αποκοπή πτερυγίου) για όλα τα ψάρια. Η πληροφορία αυτή χρησιμοποιείται για τη δημιουργία των ζευγών ζευγαρώματος.

Εντός τριών ημερών μετά τον προσδιορισμό του γονοτυπικού φύλου κάθε ψαριού, δημιουργούνται με τυχαίο τρόπο 12 ζεύγη αναπαραγωγής ανά αγωγή και 24 ζεύγη ανά μάρτυρα. Δύο ψάρια XX και XY από κάθε πανομοιότυπο δείγμα επιλέγονται τυχαία, συγχωνεύονται κατά φύλο και, στη συνέχεια, γίνεται τυχαία επιλογή για τη δημιουργία ενός ζεύγους αναπαραγωγής (ζεύγος XX-XY). Δημιουργούνται τουλάχιστον 12 πανομοιότυπα δείγματα ανά αγωγή με τη χημική ουσία και τουλάχιστον 24 πανομοιότυπα δείγματα για τον μάρτυρα, με ένα ζεύγος αναπαραγωγής ανά πανομοιότυπο δείγμα. Εάν ένα πανομοιότυπο δείγμα δεν διαθέτει είτε δύο ψάρια XX είτε δύο ψάρια XY για συγχώνευση, τα ψάρια με τον κατάλληλο γονότυπο φύλου θα πρέπει να λαμβάνονται από άλλα δείγματα

της ίδιας αγωγής.

Τα εναπομείναντα ψάρια (8 ψάρια ανά πανομοιότυπο δείγμα κατά μέγιστο) θανατώνονται με ευθανασία και πραγματοποιείται δειγματοληψία για τις διάφορες παραμέτρους ατόμων πριν την ενηλικίωση. Τα δεδομένα *dmv* (XX ή XY) για όλα τα δείγματα ατόμων πριν την ενηλικίωση διατηρούνται προκειμένου να διασφαλιστεί ότι όλα τα δεδομένα παραμέτρων μπορούν να συσχετιστούν με το γενετικό φύλο κάθε μεμονωμένου ατόμου.

Εβδομάδες δοκιμής 13-14 (F1)

Η έκθεση συνεχίζεται, καθώς τα ζεύγη αναπαραγωγής ατόμων πριν την ενηλικίωση αναπτύσσονται σε ενήλικα άτομα. Την 98η ημέρα δοκιμής (δηλ. την ημέρα προτού ξεκινήσει η συλλογή των αυγών), τα αυγά απομακρύνονται από τα ενυδρεία και τα θηλυκά.

Εβδομάδες δοκιμής 15-17 (F1)

Τα αυγά ωοτοκίας συλλέγονται καθημερινά επί 21 διαδοχικές ημέρες σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα, και αξιολογούνται ως προς τη γεννητικότητα και τη γονιμότητα.

Εβδομάδα δοκιμής 18 (επανάληψη της 4ης εβδομάδας δοκιμής) (F1 και F2)

Το πρωί της 120ης ημέρας δοκιμής γίνεται συλλογή των αυγών σε κάθε δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος. Τα συλλεχθέντα αυγά αξιολογούνται και τα γονιμοποιημένα αυγά (αφού αφαιρεθούν τα νημάτια) καθενός από τα ζεύγη αναπαραγωγής συγχωνεύονται ανά αγωγή, και κατανέμονται συστηματικά σε θαλάμους επώασης αυγών, με 20 γονιμοποιημένα αυγά ανά επωαστήρα. Οι επωαστήρες μπορούν να τοποθετούνται σε χωριστές «δεξαμενές επωαστήρων» που διαμορφώνονται για κάθε αγωγή ή στη δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος, στην οποία θα τοποθετηθούν μετά την εκκόλαψη οι εκκολαφθείσες προνύμφες. Συνιστάται τα έμβρυα να συλλέγονται σε μία μόνο ημέρα· ωστόσο, εάν δεν υπάρχουν αρκετά έμβρυα, μπορούν να συλλέγονται και δεύτερη ημέρα. Εάν συλλέγονται σε δύο ημέρες, όλα τα έμβρυα των αγωγών που συλλέχθηκαν την πρώτη ημέρα συγχωνεύονται με τα έμβρυα που συλλέχθηκαν τη δεύτερη ημέρα. Στη συνέχεια, το σύνολο των συγχωνευμένων εμβρύων για κάθε αγωγή κατανέμεται τυχαία σε καθένα από τους επωαστήρες πανομοιότυπων δειγμάτων, σε αναλογία 20 εμβρύων ανά επωαστήρα. Σημείωση: Σε περίπτωση που για μια μεμονωμένη αγωγή απαιτείται δεύτερη ημέρα συλλογής, η ίδια διαδικασία θα πρέπει να ακολουθείται για όλες τις αγωγές (περιλαμβανομένων των μαρτύρων). Εάν μετά τη δεύτερη ημέρα συλλογής οι αριθμοί των εμβρύων εξακολουθούν να μην αρκούν για την τοποθέτηση πληθυσμού 20 εμβρύων ανά επωαστήρα αγωγής, μειώστε τον αριθμό των εμβρύων που τοποθετούνται σε επωαστήρες σε 15 έμβρυα ανά επωαστήρα για τη συγκεκριμένη αγωγή. Εάν δεν υπάρχουν αρκετά έμβρυα ώστε να τοποθετηθούν 15 ανά επωαστήρα, μειώστε τον αριθμό των επωαστήρων πανομοιότυπων δειγμάτων μέχρις ότου ο αριθμός των εμβρύων να επαρκεί για την τοποθέτηση 15 εμβρύων ανά επωαστήρα.

Την 121η ημέρα δοκιμής (ή την 122η ημέρα δοκιμής, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι η F2 θα ξεκινήσει καλά), τα ζεύγη αναπαραγωγής της F1 θανατώνονται και αναλύονται ως

προς τις παραμέτρους ενήλικων ατόμων. Εφόσον απαιτείται, τα ζεύγη αναπαραγωγής της F1 μπορούν να διατηρούνται επί 1-2 επιπλέον ημέρες προκειμένου να δημιουργηθεί νέα γενεά F2.

Εβδομάδες δοκιμής 19-20 (F2)

Μία ή δύο ημέρες πριν από την αναμενόμενη έναρξη της εκκόλαψης, σταματήστε ή μειώστε την ανάδευση των επωαζόμενων αυγών προκειμένου να επισπεύσετε την εκκόλαψη. Εάν η δοκιμή λήξει πριν την ολοκλήρωση της εκκόλαψης της γενεάς F2, τα ιχθύδια καταμετρώνται και απορρίπτονται καθημερινά. (Τα έμβρυα που δεν έχουν εκκολαφθεί μετά από παρατεταμένο διάστημα επώασης, δηλαδή μετά από χρονικό διάστημα διπλάσιο αυτού του διάμεσου αριθμού ημερών εκκόλαψης του μάρτυρα, θεωρούνται μη βιώσιμα).

Προσάρτημα 10

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα είδη των βιολογικών δεδομένων που λαμβάνονται με τη δοκιμή MEOGRT δεν προκύπτουν αποκλειστικά με αυτή, και, εξαιρουμένων των δεδομένων για τις παθολογικές καταστάσεις, έχουν αναπτυχθεί πολλές κατάλληλες στατιστικές μεθοδολογίες για την ορθή ανάλυση παρεμφερών δεδομένων, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των δεδομένων, περιλαμβανομένης της κανονικότητας, της ομοιογένειας της διασποράς, του κατά πόσον ο σχεδιασμός της μελέτης είναι κατάλληλος για έλεγχο υπόθεσης ή ανάλυση παλινδρόμησης, των παραμετρικών έναντι των μη παραμετρικών δοκιμών, κ.λπ. Καταρχήν, οι προτεινόμενες στατιστικές αναλύσεις συμμορφώνονται προς τις συστάσεις του ΟΟΣΑ για τα δεδομένα οικοτοξικότητας (ΟΟΣΑ 2006), και στο σχήμα 2 φαίνεται ένα διάγραμμα ροής λήψης αποφάσεων για την ανάλυση δεδομένων MEOGRT.

Θεωρείται ότι, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, τα σύνολα δεδομένων θα εμφανίζουν μονοτονικές αποκρίσεις. Επιπλέον, θα πρέπει να εξετάζεται το θέμα της χρήσης μονόπλευρου στατιστικού ελέγχου έναντι της χρήσης αμφίπλευρου στατιστικού ελέγχου. Συνιστάται η χρήση μονόπλευρων ελέγχων, εκτός εάν υπάρχουν βάσιμοι βιολογικοί λόγοι που καθιστούν τη χρήση τους μη αρμόζουσα. Παρότι στη συνέχεια προτείνονται ορισμένοι στατιστικοί έλεγχοι, εάν αναπτυχθούν καταλληλότερες και/ή ισχυρότερες στατιστικές μέθοδοι που μπορούν να εφαρμοστούν στα συγκεκριμένα δεδομένα που προκύπτουν με την MEOGRT, θα χρησιμοποιούνται οι εν λόγω μέθοδοι προκειμένου να αξιοποιηθούν τα πλεονεκτήματά τους.

Τα δεδομένα από την MEOGRT θα πρέπει να αναλύονται χωριστά για κάθε γονοτυπικό φύλο. Για την ανάλυση των δεδομένων από ψάρια με αναστροφή φύλου (είτε αρσενικών XX ή θηλυκών XY) χρησιμοποιούνται δύο στρατηγικές. 1) Λογοκρισία όλων των δεδομένων που προέρχονται από ψάρια με αναστροφή φύλου σε όλη τη δοκιμή, εκτός του επιπολασμού των περιπτώσεων αναστροφής φύλου σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα. 2) Διατήρηση των δεδομένων που προέρχονται από όλα τα ψάρια με αναστροφή φύλου στο σύνολο δεδομένων και ανάλυσή τους με βάση τον γονότυπο.

Ιστοπαθολογικά δεδομένα

Τα ιστοπαθολογικά δεδομένα αναφέρονται υπό μορφή βαθμολογιών σοβαρότητας που αξιολογούνται με χρήση μιας στατιστικής διαδικασίας που αναπτύχθηκε πρόσφατα, της διαδικασίας Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS) (Green *et al.*, 2014). Κατά τη διόρθωση κατά Rao-Scott διατηρούνται οι πληροφορίες δοκιμής-πανομοιότυπου δείγματος· η διαδικασία by Slices (κατά τομές) βασίζεται στη βιολογική προσδοκία ότι οι βαθμολογίες σοβαρότητας τείνουν να αυξάνονται καθώς αυξάνονται οι συγκεντρώσεις αγωγής. Για κάθε διάγνωση, στα αποτελέσματα της RSCABS προσδιορίζονται οι αγωγές που παρουσιάζουν υψηλότερο επιπολασμό παθολογικών καταστάσεων και το σχετικό επίπεδο σοβαρότητας.

Δεδομένα γεννητικότητας

Οι αναλύσεις για δεδομένα γεννητικότητας περιλαμβάνουν έλεγχο αποκλιμάκωσης Jonckheere-Terpstra ή Williams για τον προσδιορισμό των επιδράσεων της αγωγής, υπό την προϋπόθεση ότι τα δεδομένα συνάδουν με μονοτονική σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης. Στο πλαίσιο ελέγχου αποκλιμάκωσης, όλες οι συγκρίσεις πραγματοποιούνται στο επίπεδο σημασίας 0,05, χωρίς να πραγματοποιείται διόρθωση ως προς τον αριθμό συγκρίσεων. Παρότι αναμένεται ότι τα δεδομένα θα συνάδουν με μονοτονική σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, αυτό μπορεί να επαληθευτεί είτε μέσω οπτικού ελέγχου των δεδομένων είτε μέσω του υπολογισμού γραμμικών και τετραγωνικών αντιθέσεων των μέσων όρων των αγωγών μετά από μετασχηματισμό των δεδομένων με βάση τη σειρά κατάταξης. Ο έλεγχος τάσεων πραγματοποιείται, εκτός εάν η τετραγωνική αντίθεση είναι σημαντική και η γραμμική αντίθεση δεν είναι. Διαφορετικά, για τον προσδιορισμό των επιδράσεων της αγωγής χρησιμοποιείται ο έλεγχος Dunnett, εφόσον τα δεδομένα είναι κανονικά κατανεμημένα με ομοιογενείς διασπορές. Σε περίπτωση μη συμμόρφωσης με τις εν λόγω απαιτήσεις, χρησιμοποιείται ο έλεγχος Dunn με διόρθωση κατά Bonferroni-Holm. Όλοι οι ενδεδειγμένοι έλεγχοι πραγματοποιούνται ανεξάρτητα από οποιοδήποτε συνολικό έλεγχο F ή Kruskal-Wallis. Περισσότερες πληροφορίες παρατίθενται στο ΟΟΣΑ 2006.

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές μέθοδοι, όπως γενικευμένο γραμμικό μοντέλο με σφάλματα Poisson όσον αφορά τις μετρήσεις των αυγών (χωρίς μετασχηματισμό), εφόσον τεκμηριώνονται στατιστικά (Cameron and Trividi, 2013). Σε περίπτωση χρήσης εναλλακτικής προσέγγισης, συνιστάται να αναζητάται η παροχή συμβουλών επί στατιστικών θεμάτων.

Καθημερινή μέτρηση αυγών σε μία γενεά

Το μοντέλο ANOVA προκύπτει ως εξής: $Y = \text{χρόνος} * \text{χρόνος} + \text{αγωγή} + * \text{αγωγή} + \text{χρόνος} * \text{αγωγή} + * \text{χρόνος} * \text{αγωγή}$, με τυχαίες επιδράσεις «πανομοιότυπο δείγμα(γενεά*αγωγή)» και «χρόνος*πανομοιότυπο δείγμα(αγωγή)», που συνεκτιμά συνιστώσες άνισης διασποράς και των δύο τύπων στις διάφορες γενεές. Εδώ, ο όρος «χρόνος» αναφέρεται στη συχνότητα των μετρήσεων αυγών (π.χ. ημέρα ή εβδομάδα). Πρόκειται για ανάλυση επαναλαμβανόμενων μετρήσεων, στο πλαίσιο της οποίας οι συσχετισμοί μεταξύ των παρατηρήσεων επί των ίδιων πανομοιότυπων δειγμάτων συνεκτιμούν τον χαρακτήρα επαναλαμβανόμενων μετρήσεων των δεδομένων.

Οι κύριες επιδράσεις της αγωγής ελέγχονται με χρήση του ελέγχου Dunnett (ή Dunnett-Hsu), στο πλαίσιο του οποίου πραγματοποιείται διόρθωση ως προς τον αριθμό των συγκρίσεων. Οι διορθώσεις ως προς την κύρια επίδραση της γενεάς ή του χρόνου είναι απαραίτητες, δεδομένου ότι με τους δύο εν λόγω παράγοντες δεν υφίσταται επίπεδο «ελέγχου» και κάθε ζεύγος επιπέδων αποτελεί σύγκριση που είναι πιθανό να παρουσιάζει ενδιαφέρον. Για τις εν λόγω δύο κύριες επιδράσεις, εάν ο έλεγχος F είναι σημαντικός στο επίπεδο 0,05, οι συγκρίσεις βάσει ζευγών στα διάφορα επίπεδα του συγκεκριμένου παράγοντα μπορούν να ελέγχονται στο επίπεδο 0,05, χωρίς περαιτέρω διόρθωση.

Το μοντέλο περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις δύο και τριών παραγόντων, κατά τρόπον ώστε η

κύρια επίδραση, για παράδειγμα, του χρόνου μπορεί να μην είναι σημαντική, ακόμη και αν ο χρόνος έχει σημαντικές επιπτώσεις στα αποτελέσματα. Ως εκ τούτου, εάν μια αλληλεπίδραση δύο ή τριών παραγόντων που σχετίζεται με τον χρόνο είναι σημαντική στο επίπεδο 0,05, τότε είναι εφικτή η αποδοχή των συγκρίσεων των επιπέδων του χρόνου στο επίπεδο σημασίας 0,05, χωρίς περαιτέρω διόρθωση.

Ακολουθούν οι έλεγχοι F για τη σημασία της αγωγής στον χρόνο, οι καλούμενες τομές στον πίνακα ANOVA. Εάν, για παράδειγμα, η τομή για την αγωγή στη γενεά F1 και τον χρόνο 12, είναι σημαντική στο επίπεδο 0,05, οι συγκρίσεις βάσει ζευγών για την αγωγή στη γενεά F1 και τον χρόνο 12 μπορούν να γίνουν αποδεκτές στο επίπεδο 0,05, χωρίς περαιτέρω διόρθωση. Παρόμοιες δηλώσεις ισχύουν και τους ελέγχους για τον χρόνο στη F1 και την αγωγή καθώς και για τη γενεά στον χρόνο και την αγωγή.

Τέλος, όσον αφορά συγκρίσεις που δεν εμπίπτουν σε καμία από τις προαναφερθείσες κατηγορίες, οι συγκρίσεις θα πρέπει να διορθώνονται με χρήση της διόρθωσης των τιμών p κατά Bonferroni-Holm. Περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τις αναλύσεις των εν λόγω μοντέλων διατίθενται στα Hocking (1985) και Hochberg and Tamhane (1987).

Εναλλακτικά, τα ανεπεξέργαστα δεδομένα καταγράφονται και παρουσιάζονται στην έκθεση μελέτης ως γεννητικότητα (αριθμός αυγών) ανά πανομοιότυπο δείγμα για κάθε ημέρα. Θα πρέπει να υπολογίζεται ο μέσος όρος πανομοιότυπου δείγματος των ανεπεξέργαστων δεδομένων, και, στη συνέχεια, θα πρέπει να εφαρμόζεται μετασχηματισμός τετραγωνικής ρίζας. Θα πρέπει να υπολογίζεται μονόδρομος έλεγχος διασποράς ANOVA επί των μετασχηματισθέντων μέσων όρων πανομοιότυπου δείγματος, ακολουθούμενος από αντιθέσεις Dunnett. Επίσης, μπορεί να είναι σκόπιμος ο οπτικός έλεγχος των δεδομένων γεννητικότητας κάθε αγωγής και/ή πανομοιότυπου δείγματος με διάγραμμα διασποράς που παρουσιάζει τα δεδομένα στην πάροδο του χρόνου. Κατ' αυτόν τον τρόπο, παρέχεται η δυνατότητα άτυπης αξιολόγησης των δυνητικών επιδράσεων με την πάροδο του χρόνου.

Όλα τα υπόλοιπα βιολογικά δεδομένα

Οι στατιστικές αναλύσεις βασίζονται στην υποκείμενη παραδοχή ότι εάν επιλεχθεί η κατάλληλη δόση, τα δεδομένα θα είναι μονοτονικά. Ως εκ τούτου, θεωρείται ότι τα δεδομένα είναι μονοτονικά και ότι αξιολογούνται τυπικά ως προς τη μονοτονικότητα με χρήση γραφικών και τετραγωνικών αντιθέσεων. Εάν τα δεδομένα είναι μονοτονικά, συνιστάται η διενέργεια ελέγχου τάσεων Jonckheere-Terpstra στις διάμεσες τιμές των πανομοιότυπων δειγμάτων (όπως συνιστάται στο ΟΟΣΑ 2006). Εάν η τετραγωνική αντίθεση είναι σημαντική και η γραμμική αντίθεση δεν είναι, τα δεδομένα θεωρούνται μη μονοτονικά.

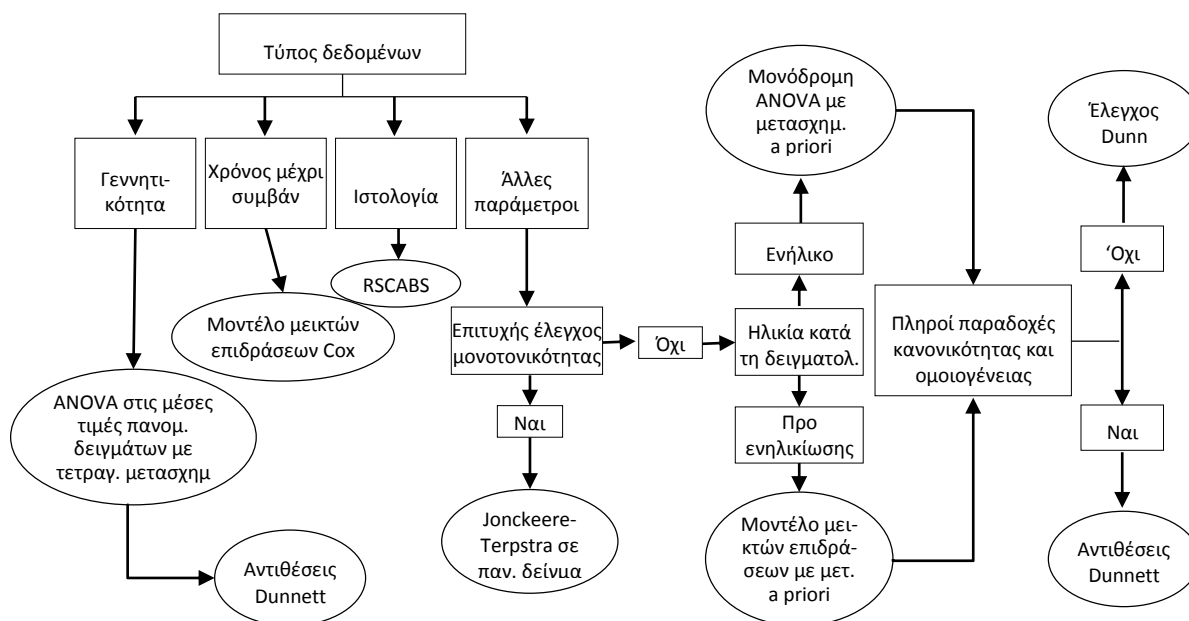
Εάν τα δεδομένα είναι μη μονοτονικά, ιδίως λόγω της μειωμένης απόκρισης της μίας ή δύο αγωγών με την υψηλότερη δόση, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο λογοκρισίας του συνόλου δεδομένων, ούτως ώστε η ανάλυση να πραγματοποιηθεί χωρίς τις εν λόγω αγωγές. Η εν λόγω απόφαση θα πρέπει να βασίζεται στην κρίση ειδικών και στο σύνολο των διαθέσιμων δεδομένων, ιδίως των δεδομένων που υποδεικνύουν έκδηλη τοξικότητα στα συγκεκριμένα επίπεδα αγωγής.

Για το βάρος και το μήκος, δεν συνιστάται η εφαρμογή μετασχηματισμών, αν και ενδέχεται να είναι απαραίτητοι περιστασιακά. Ωστόσο, για τα δεδομένα λεκιθογενίνης συνιστάται η εφαρμογή λογαριθμικού μετασχηματισμού· για τα δεδομένα SSC (θηλοειδείς αποφύσεις εδρικού περυγίου) συνιστάται μετασχηματισμός τετραγωνικής ρίζας· για τα δεδομένα σχετικά με την ποσοστιαία εκκόλαψη, την ποσοστιαία επιβίωση, την αναλογία φύλων και τα ποσοστά γόνιμων αυγών συνιστάται μετασχηματισμός τετραγωνικής ρίζας τόξου ημιτόνου. Ο χρόνος μέχρι την εκκόλαψη και ο χρόνος μέχρι την πρώτη ωοτοκία θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δεδομένα χρόνου μέχρι το συμβάν, με τα μεμονωμένα έμβρυα που δεν εκκολάπτονται εντός του καθορισμένου χρονικού διαστήματος ή τα πανομοιότυπα δείγματα που δεν εμφανίζουν ποτέ ωοτοκία να αντιμετωπίζονται ως λογοκριμένα εκ δεξιών δεδομένα. Ο χρόνος μέχρι την εκκόλαψη θα πρέπει να υπολογίζεται με βάση τη διάμεση ημέρα εκκόλαψης κάθε πανομοιότυπου δείγματος. Οι εν λόγω παράμετροι θα πρέπει να αναλύονται με χρήση μοντέλου αναλογικών κινδύνων Cox μεικτών επιδράσεων.

Τα βιολογικά δεδομένα από δείγματα ενήλικων ατόμων περιλαμβάνουν μία μέτρηση ανά πανομοιότυπο δείγμα, δηλαδή υπάρχει ένα ψάρι XX και ένα ψάρι XY ανά ενυδρείο πανομοιότυπου δείγματος. Ως εκ τούτου, συνιστάται ο υπολογισμός μονόδρομου ελέγχου διασποράς ANOVA επί των μέσων όρων πανομοιότυπου δείγματος. Εφόσον επαληθεύονται οι παραδοχές του ελέγχου ANOVA (η κανονικότητα και η ομοιογένεια της διασποράς συμφωνούν με τις αξιολογήσεις επί των καταλοίπων του ελέγχου ANOVA με έλεγχο Shapiro-Wilk και έλεγχο Levene αντίστοιχα), θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αντιθέσεις Dunnett για τον προσδιορισμό των αγωγών που ήταν διαφορετικές σε σχέση με τον μάρτυρα. Από την άλλη πλευρά, εάν οι παραδοχές του ANOVA δεν πληρούνται, θα πρέπει να διενεργείται έλεγχος Dunn για τον προσδιορισμό των αγωγών που ήταν διαφορετικές από τον μάρτυρα. Συνιστάται η διεξαγωγή παρεμφερούς διαδικασίας για τα δεδομένα υπό μορφή ποσοστών (γονιμότητα, εκκόλαψη και επιβίωση).

Τα βιολογικά δεδομένα από δείγματα ατόμων πριν την ενηλικίωση περιλαμβάνουν από 1 έως 8 μετρήσεις ανά πανομοιότυπο δείγμα, δηλαδή μπορεί να υπάρχουν μεταβλητοί αριθμοί ατόμων που συνεισφέρουν στον μέσο όρο πανομοιότυπου δείγματος για κάθε γονοτυπικό φύλο. Ως εκ τούτου, εάν επαληθεύονται οι παραδοχές για την κανονικότητα και την ομοιογένεια της διασποράς (επί των καταλοίπων του ANOVA μεικτών επιδράσεων), συνιστάται η χρήση μοντέλου ANOVA μεικτών δεδομένων, ακολουθούμενου από αντιθέσεις Dunnett. Εάν δεν επαληθεύονται, θα πρέπει να διενεργείται έλεγχος Dunn για τον προσδιορισμό των αγωγών που ήταν διαφορετικές από τον μάρτυρα.

Σχήμα 2: Διάγραμμα ροής για τις συνιστώμενες στατιστικές διαδικασίες στο πλαίσιο ανάλυσης δεδομένων της MEOGRT.



Βιβλιογραφία

- (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 and 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 and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

Γ.53 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΥΞΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΠΡΟΝΥΜΦΩΝ ΑΜΦΙΒΙΩΝ (LAGDA)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 241 του ΟΟΣΑ (2015). Η ανάγκη ανάπτυξης και επικύρωσης μιας δοκιμασίας για τον προσδιορισμό και τον χαρακτηρισμό των δυσμενών συνεπειών της έκθεσης σε τοξικές χημικές ουσίες στα αμφίβια προέκυψε από ανησυχίες ότι τα περιβαλλοντικά επίπεδα χημικών ουσιών μπορεί να προκαλέσουν δυσμενείς επιδράσεις τόσο στον άνθρωπο όσο και στη χλωροπανίδα. Η κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών του ΟΟΣΑ για τη δοκιμασία αύξησης και ανάπτυξης προνυμφών αμφιβίων (LAGDA) περιγράφει μια δοκιμή τοξικότητας με ένα είδος αμφιβίου η οποία εξετάζει την αύξηση και την ανάπτυξη από τη γονιμοποίηση μέχρι το πρώιμο νεαρό στάδιο. Πρόκειται για μια δοκιμασία (συνήθως 16 εβδομάδων) που αξιολογεί την πρώιμη ανάπτυξη, τη μεταμόρφωση, την επιβίωση, τη σωματική αύξηση και τη μερική αναπαραγωγική ωρίμανση. Επιπλέον, παρέχει τη δυνατότητα μέτρησης μιας σειράς άλλων παραμέτρων που επιτρέπουν τη διαγνωστική αξιολόγηση χημικών ουσιών για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες ότι αποτελούν ενδοκρινικούς διαταράκτες (EDC) ή άλλου είδους ουσιών τοξικών για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή. Η μέθοδος που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι αποτέλεσμα της εργασίας επικύρωσης για τον αφρικανικό ονυχοφόρο βάτραχο (*Xenopus laevis*) που διεξήγαγε ο Οργανισμός Προστασίας Περιβάλλοντος (EPA) των ΗΠΑ, με υποστηρικτικές εργασίες στην Ιαπωνία (1). Παρότι είναι δυνατή η προσαρμογή και άλλων ειδών αμφιβίων σε πρωτόκολλα δοκιμής σωματικής αύξησης και ανάπτυξης στο πλαίσιο των οποίων η δυνατότητα προσδιορισμού του γενετικού φύλου αποτελεί σημαντικό στοιχείο, οι ειδικές μέθοδοι και τα τελικά σημεία βάσει παρατήρησης που περιγράφονται αναλυτικά στην παρούσα μέθοδο δοκιμών εφαρμόζονται μόνο στο είδος *Xenopus laevis*.
2. Η δοκιμασία LAGDA αποτελεί μια δοκιμή ανώτερης βαθμίδας σε αμφίβιο για τη συλλογή πιο ολοκληρωμένων πληροφοριών συγκέντρωσης-απόκρισης σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις, η οποία είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό και τον χαρακτηρισμό της επικινδυνότητας, καθώς και για την αξιολόγηση του οικολογικού κινδύνου. Η δοκιμασία εντάσσεται στο επίπεδο 4 του εννοιολογικού πλαισίου του ΟΟΣΑ για τις δοκιμές και την αξιολόγηση ενδοκρινικών διαταρακτών, όπου οι *in vivo* δοκιμασίες παρέχουν επίσης δεδομένα για τις δυσμενείς επιδράσεις σε παραμέτρους που σχετίζονται με το ενδοκρινικό σύστημα (2). Ο γενικός πειραματικός σχεδιασμός περιλαμβάνει την έκθεση εμβρύων *X. laevis* σταδίου 8-10 κατά Nieuwkoop και Faber (NF) (3) σε τουλάχιστον τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας (γενικά διατεταγμένες σε ημιλογαριθμικά διαστήματα τουλάχιστον) και μάρτυρα/-ων έως 10 εβδομάδες μετά τον

διάμεσο χρόνο έως το στάδιο 62 κατά NF στον μάρτυρα, με ένα ενδιάμεσο μερικό δείγμα (υποδείγμα) στο στάδιο 62 κατά NF [≤ 45 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση· συνήθως περί τις 45 ημέρες (dpf)]. Χρησιμοποιούνται τέσσερα πανομοιότυπα δείγματα σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής και οκτώ πανομοιότυπα δείγματα για τον μάρτυρα. Στις παραμέτρους που αξιολογούνται κατά τη διάρκεια της έκθεσης (στο ενδιάμεσο υποδείγμα και το τελικό δείγμα κατά την ολοκλήρωση της δοκιμής) περιλαμβάνονται παράμετροι ενδεικτικές γενικευμένης τοξικότητας: θνησιμότητα, μη φυσιολογική συμπεριφορά και προσδιορισμοί σωματικής αύξησης (μήκος και βάρος), καθώς και παράμετροι που έχουν σχεδιαστεί για τον χαρακτηρισμό ειδικών τρόπων δράσης ενδοκρινικής τοξικότητας που στοχεύουν φυσιολογικές διεργασίες διαμεσολαβούμενες από τα οιστρογόνα, τα ανδρογόνα ή τις θυρεοειδικές ορμόνες. Η μέθοδος δίνει πρωταρχική έμφαση στις δυνητικές επιδράσεις που σχετίζονται με τον πληθυσμό (ήτοι δυσμενείς επιπτώσεις στην επιβίωση, την ανάπτυξη, τη σωματική αύξηση και την αναπαραγωγική ανάπτυξη) για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης μη παρατηρούμενου αποτελέσματος (NOEC) ή της αποτελεσματικής συγκέντρωσης που προκαλεί μεταβολή x% (ECx) στη μετρούμενη παράμετρο. Ωστόσο, θα πρέπει να επισημανθεί ότι οι προσεγγίσεις της ECx σπανίως είναι κατάλληλες για μεγάλες μελέτες αυτού του είδους, στο πλαίσιο των οποίων ενδέχεται να είναι πρακτικά αδύνατη η αύξηση του αριθμού των συγκεντρώσεων δοκιμής προκειμένου να είναι δυνατός ο προσδιορισμός της επιθυμητής ECx. Θα πρέπει, επίσης, να σημειωθεί ότι η μέθοδος δεν καλύπτει το αναπαραγωγικό στάδιο αυτό καθαυτό. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

3. Λόγω του περιορισμένου αριθμού, αφενός, των χημικών ουσιών που έχουν υποβληθεί σε δοκιμή και, αφετέρου, των εργαστηρίων που μετείχαν στην επικύρωση αυτής της σχετικά πολύπλοκης δοκιμασίας, ιδίως δεδομένου ότι η διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα δεν τεκμηριώνεται μέχρι στιγμής με πειραματικά δεδομένα, αναμένεται ότι, όταν καταστεί διαθέσιμος επαρκής αριθμός μελετών ώστε να διαπιστωθεί ο αντίκτυπος του νέου αυτού σχεδιασμού μελέτης, η κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 241 του ΟΟΣΑ θα επανεξεταστεί και, αν χρειαστεί, θα αναθεωρηθεί με βάση την αποκτηθείσα πείρα. Η δοκιμασία LAGDA αποτελεί μια σημαντική δοκιμασία για την αντιμετώπιση των δυνητικών παραγόντων που συντελούν στη μείωση των πληθυσμών των αμφιβίων, μέσω της αξιολόγησης των επιπτώσεων από την έκθεση σε χημικές ουσίες κατά το ευαίσθητο προνυμφικό στάδιο, όπου οι επιπτώσεις στην επιβίωση και την ανάπτυξη, συμπεριλαμβανομένης της φυσιολογικής ανάπτυξης των αναπαραγωγικών οργάνων, μπορεί να επηρεάσουν δυσμενώς τους πληθυσμούς.
4. Η δοκιμή έχει σχεδιαστεί με σκοπό την ανίχνευση επιδράσεων κορυφαίου επιπέδου από ενδοκρινικούς και μη ενδοκρινικούς μηχανισμούς και περιλαμβάνει διαγνωστικά τελικά

σημεία τα οποία σχετίζονται, εν μέρει, ειδικά με βασικές ενδοκρινικές διαδικασίες. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι, πριν από την ανάπτυξη της δοκιμασίας LAGDA, δεν υπήρχε επικυρωμένη δοκιμασία για τον σκοπό αυτό στα αμφίβια.

5. Πριν από την έναρξη της δοκιμασίας, είναι σημαντικό να υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με τις φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ιδίως προκειμένου να είναι δυνατή η παραγωγή σταθερών χημικών διαλυμάτων. Είναι επίσης αναγκαίο να υπάρχει επαρκώς ευαίσθητη αναλυτική μέθοδος για την επαλήθευση των συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Για μια περίοδο 16 εβδομάδων περίπου, η δοκιμασία απαιτεί συνολικό αριθμό 480 ζώων, ήτοι εμβρύων *X. laevis* (ή 640 εμβρύων, αν χρησιμοποιείται μάρτυρας με διαλύτη) προκειμένου να διασφαλιστεί επαρκής ισχύς της δοκιμής για την αξιολόγηση των παραμέτρων που σχετίζονται με τον πληθυσμό, όπως η σωματική αύξηση, η ανάπτυξη και η αναπαραγωγική ωρίμανση.
6. Πριν από τη χρήση της μεθόδου δοκιμών για δοκιμές κανονιστικού χαρακτήρα ενός μείγματος, θα πρέπει να εξετάζεται κατά πόσον η μέθοδος αποδίδει αποδεκτά αποτελέσματα για τον επιδιωκόμενο κανονιστικό σκοπό. Επιπλέον, η παρούσα δοκιμασία δεν αξιολογεί άμεσα τη γεννητικότητα και, ως εκ τούτου, ενδέχεται να μην ενδείκνυται για χρήση σε πιο προχωρημένο στάδιο από το επίπεδο 4 του εννοιολογικού πλαισίου του ΟΟΣΑ για τις δοκιμές και την αξιολόγηση ενδοκρινικών διαταρακτών.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΒΑΣΗ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Πολλά από τα στοιχεία που διαθέτουμε σήμερα σχετικά με τη βιολογία των αμφιβίων έχουν ληφθεί με το εργαστηριακό είδος-μοντέλο *X. laevis*. Αυτό το είδος μπορεί να εκτραφεί συνήθως στο εργαστήριο, η ωορρηξία μπορεί να προκληθεί με ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) και υπάρχουν άμεσα διαθέσιμα ζωικά αποθέματα από εκτροφείς του εμπορίου.
8. Όπως όλα τα σπονδυλωτά, η αναπαραγωγή στα αμφίβια ελέγχεται από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων (HPG) (4). Τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα είναι μεσολαβητές αυτού του ενδοκρινικού συστήματος και κατευθύνουν την ανάπτυξη και τη φυσιολογία των σεξουαλικά διμορφικών ιστών. Υπάρχουν τρεις ξεχωριστές φάσεις στον κύκλο ζωής των αμφιβίων όταν αυτός ο άξονας είναι ιδιαίτερα δραστήριος: (1) διαφοροποίηση των γονάδων κατά την ανάπτυξη των προνυμφών, (2) ανάπτυξη δευτερευόντων χαρακτηριστικών φύλου και η ωρίμανση των γονάδων κατά τη διάρκεια της νεαρής φάσης, και (3) λειτουργική αναπαραγωγή των ενηλίκων. Κάθε ένα από αυτά τα τρία αναπτυξιακά παράθυρα είναι πιθανώς επιρρεπές σε ενδοκρινικές διαταραχές από ορισμένες χημικές ουσίες όπως τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα, οδηγώντας τελικά σε απώλεια της αναπαραγωγικής ικανότητας των οργανισμών.

9. Οι γονάδες αρχίζουν να αναπτύσσονται στο στάδιο 43 κατά NF, οπότε και εμφανίζεται η αμφιδύναμη γεννητική ταινία. Η διαφοροποίηση των γονάδων αρχίζει στο στάδιο 52 κατά NF όταν πρωτογενή γεννητικά κύτταρα είτε μεταναστεύουν σε μυελώδη ιστό (αρσενικά) είτε παραμένουν στη φλοιώδη μοίρα (θηλυκά) των αναπτυσσόμενων γονάδων (3). Για πρώτη φορά αναφέρθηκε ότι αυτή η διαδικασία σεξουαλικής διαφοροποίησης των γονάδων είναι ευαίσθητη σε χημική αλλοίωση στον *Xenopus* κατά τη δεκαετία του 1950 (5) (6). Η έκθεση των γυρίνων στην οιστραδιόλη κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου διαφοροποίησης των γονάδων έχει ως αποτέλεσμα την αναστροφή του φύλου των αρσενικών, τα οποία όταν ενηλικιώνονται είναι πλήρως λειτουργικά θηλυκά (7) (8). Η λειτουργική αναστροφή του φύλου θηλυκών σε αρσενικά είναι επίσης δυνατή και έχει αναφερθεί μετά την εμφύτευση ιστού όρχεων στους γυρίνους (9). Ωστόσο, αν και η έκθεση σε αναστολέα αρωματάσης προκαλεί επίσης λειτουργική αναστροφή του φύλου στον *X. tropicalis* (10), αυτό δεν έχει παρατηρηθεί στον *X. laevis*. Ιστορικά, οι τοξικές επιδράσεις στη διαφοροποίηση των γονάδων έχουν αξιολογηθεί με ιστολογική εξέταση των γονάδων κατά τη μεταμόρφωση και η αναστροφή του φύλου μπορούσε να προσδιοριστεί μόνο με ανάλυση της αναλογίας φύλων. Μέχρι πρόσφατα, δεν υπήρχαν μέσα για να προσδιοριστεί άμεσα το γενετικό φύλο του *Xenopus*. Ωστόσο, η πρόσφατη καθιέρωση δεικτών που συνδέονται με το φύλο στον *X. laevis* καθιστά δυνατό τον προσδιορισμό του γενετικού φύλου και επιτρέπει τον άμεσο προσδιορισμό των ζώων των οποίων το φύλο έχει αναστραφεί (11).
10. Στα αρσενικά, η ανάπτυξη νεαρών ατόμων προχωρά καθώς τα επίπεδα της τεστοστερόνης στο αίμα αυξάνονται ανάλογα με την ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου καθώς και την ανάπτυξη των όρχεων. Στα θηλυκά παράγεται οιστραδιόλη από τις ωοθήκες με αποτέλεσμα την εμφάνιση λεκιθογενίνης (VTG) στο πλάσμα, λεκιθογενετικών ωοκυττάρων στις ωοθήκες και την ανάπτυξη σαλπίγγων (12). Οι σάλπιγγες είναι δευτερογενή χαρακτηριστικά του θηλυκού φύλου που λειτουργούν στην ωρίμανση ωοκυττάρων κατά την αναπαραγωγή. Ζελατινώδη περιβλήματα εφαρμόζονται στο εξωτερικό των ωοκυττάρων καθώς περνούν μέσα από τη σάλπιγγα και συγκεντρώνονται στον ωόσακο, έτοιμα για γονιμοποίηση. Η ανάπτυξη των σαλπίγγων φαίνεται να ρυθμίζεται από τα οιστρογόνα καθώς η ανάπτυξη συσχετίζεται με τα επίπεδα οιστραδιόλης στο αίμα στα είδη *X. laevis* (13) και *X. tropicalis* (12). Έχει αναφερθεί η ανάπτυξη σαλπίγγων σε αρσενικά μετά από έκθεση σε ενώσεις πολυχλωριωμένων διφαινυλίων (14) και σε 4-tert-οκτυλοφαινόλη (15).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

11. Ο σχεδιασμός της δοκιμής περιλαμβάνει την έκθεση εμβρύων *X. laevis* σταδίων 8-10 κατά NF μέσω του ύδατος σε τουλάχιστον τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας και μάρτυρα/-ων έως 10 εβδομάδες μετά τον διάμεσο χρόνο έως το

στάδιο 62 κατά NF στον μάρτυρα, με ένα ενδιάμεσο υποδείγμα στο στάδιο 62 κατά NF. Αν και μπορεί να είναι επίσης δυνατή η χορήγηση εξαιρετικά υδρόφοβων χημικών ουσιών μέσω της τροφής, η μέχρι σήμερα εμπειρία στη χρήση αυτής της οδού έκθεσης σε αυτή τη δοκιμασία είναι μικρή. Χρησιμοποιούνται τέσσερα πανομοιότυπα δείγματα σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής και οκτώ πανομοιότυπα δείγματα για κάθε μάρτυρα. Στις παραμέτρους που αξιολογούνται κατά τη διάρκεια της έκθεσης περιλαμβάνονται τα τελικά σημεία που είναι ενδεικτικά γενικευμένης τοξικότητας [δηλαδή θνησιμότητα, μη φυσιολογική συμπεριφορά και προσδιορισμοί σωματικής αύξησης (μήκος και βάρος)], καθώς και παράμετροι που αποσκοπούν στον χαρακτηρισμό ειδικών τρόπων δράσης ενδοκρινικής τοξικότητας που στοχεύουν φυσιολογικές διεργασίες διαμεσολαβούμενες από τα οιστρογόνα, τα ανδρογόνα ή τις θυρεοειδικές ορμόνες (δηλαδή ιστοπαθολογία θυρεοειδούς, ιστοπαθολογία γονάδων και γοναδικού πόρου, ανώμαλη ανάπτυξη, λεκιθογενίνη πλάσματος (προαιρετικά) και αναλογίες γονοτυπικού/φαινοτυπικού φύλων).

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

12. Για την εγκυρότητα της δοκιμής εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια:

- η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου πρέπει να είναι $> 40 \%$ της τιμής κορεσμού με αέρα σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής·
- η θερμοκρασία πρέπει να είναι εντός της περιοχής των $21 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ και οι διαφορές μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων / μεταξύ των αγωγών δεν πρέπει να υπερβαίνουν τον $1,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ·
- το pH του διαλύματος δοκιμής πρέπει να διατηρείται μεταξύ του 6,5 και του 8,5 και οι διαφορές μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων / μεταξύ των αγωγών δεν πρέπει να υπερβαίνουν το 0,5·
- θα πρέπει να υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα διατηρήθηκαν ικανοποιητικά στα όρια του $\pm 20 \%$ του μέσου όρου των τιμών που μετρήθηκαν.
- η θνησιμότητα κατά την περίοδο έκθεσης θα πρέπει να είναι $\leq 20 \%$ σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα στους μάρτυρες·
- $\geq 70 \%$ βιωσιμότητα των αυγών που επιλέχθηκαν για την έναρξη της μελέτης.
- Ο διάμεσος χρόνος των μαρτύρων έως το στάδιο 62 κατά NF θα πρέπει να είναι ≤ 45 ημέρες.
- Το μέσο βάρος των οργανισμών δοκιμής στο στάδιο 62 κατά NF και στη λήξη της δοκιμασίας στους μάρτυρες και στους μάρτυρες με διαλύτη (εφόσον χρησιμοποιούνται) θα πρέπει να φτάνει τα $1,0 \pm 0,2$ και $11,5 \pm 3 \text{ g}$, αντίστοιχα.

13. Παρόλο που δεν αποτελεί κριτήριο εγκυρότητας, συνιστάται να είναι διαθέσιμα για ανάλυση τουλάχιστον τρία επίπεδα αγωγής με τρία μη υπονομευμένα πανομοιότυπα δείγματα. Η υπερβολική θνησιμότητα, η οποία υπονομεύει μια αγωγή, ορίζεται ως > 4 θάνατοι ($> 20\%$) σε 2 ή περισσότερα πανομοιότυπα δείγματα που δεν μπορούν να αποδοθούν σε τεχνικό σφάλμα. Θα πρέπει να είναι διαθέσιμα για ανάλυση τουλάχιστον τρία επίπεδα αγωγής χωρίς προφανή έκδηλη τοξικότητα. Ενδείξεις έκδηλης τοξικότητας περιλαμβάνουν, ενδεικτικά, επίπλευση στην επιφάνεια, παραμονή στον πυθμένα της δεξαμενής, ανεστραμμένη ή ακανόνιστη κολύμβηση, έλλειψη δραστηριότητας ανάδυσης, μη ανταπόκριση σε ερεθίσματα, μορφολογικές ανωμαλίες (π.χ. παραμορφώσεις άκρων), αιμορραγικές βλάβες και κοιλιακό οίδημα.
14. Εάν παρατηρηθεί απόκλιση από τα κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής, οι συνέπειες θα πρέπει να εκτιμώνται σε σχέση με την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της δοκιμής και οι αποκλίσεις και εκτιμήσεις αυτές θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στην έκθεση δοκιμής.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Εργαστηριακός εξοπλισμός

15. Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και, ειδικότερα, τα ακόλουθα:
- α) συσκευή ελέγχου θερμοκρασίας [π.χ. θερμαντήρες ή ψύκτες (με δυνατότητα ρύθμισης στους $21^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$)],
 - β) θερμόμετρο,
 - γ) διοφθάλμιο στερεοσκοπικό μικροσκόπιο και εργαλεία ανατομής,
 - δ) ψηφιακή φωτογραφική μηχανή με ανάλυση τουλάχιστον 4 megapixel και λειτουργία micro (εάν χρειάζεται),
 - ε) αναλυτικός ζυγός, ακριβείας 0,001 mg ή 1 μg ,
 - στ) μετρητής διαλυμένου οξυγόνου και μετρητής pH,
 - ζ) μετρητής έντασης φωτός με δυνατότητα μέτρησης σε lux.

Νερό

Πηγή και ποιότητα

16. Μπορεί να χρησιμοποιείται κάθε νερό που διατίθεται τοπικά (π.χ. νερό πηγής ή νερό βρύσης φιλτραρισμένο με ενεργό άνθρακα) και επιτρέπει τη φυσιολογική σωματική αύξηση και ανάπτυξη των γυρίνων του είδους *X. laevis* και θα πρέπει να είναι διαθέσιμα στοιχεία που αποδεικνύουν τη φυσιολογική αύξηση σε αυτό το νερό. Επειδή η ποιότητα του τοπικού νερού μπορεί να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων περιοχών, θα πρέπει να διεξάγεται ανάλυση της ποιότητας του νερού, ιδιαίτερα εάν δεν υπάρχουν

διαθέσιμα ιστορικά δεδομένα σχετικά με τη χρησιμότητα του νερού για την εκτροφή προνυμφών αμφιβίων. Όταν είναι γνωστό ότι η ποιότητα του νερού αραίωσης είναι σχετικά σταθερή, θα πρέπει να γίνονται μετρήσεις βαρέων μετάλλων (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), σημαντικών ανιόντων και κατιόντων (π.χ. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), φυτοφαρμάκων, ολικού οργανικού άνθρακα και αιωρούμενων στερεών προτού ξεκινήσει η δοκιμή και/ή π.χ. κάθε έξι μήνες. Μερικά χημικά χαρακτηριστικά αποδεκτού νερού αραίωσης καταγράφονται στο προσάρτημα 2.

Συγκέντρωση ιωδίου στο νερό δοκιμής

17. Για να μπορεί ο θυρεοειδής αδένας να συνθέτει θυρεοειδικές ορμόνες που υποστηρίζουν τη φυσιολογική μεταμόρφωση, πρέπει να υπάρχει διαθέσιμη επαρκής ποσότητα ιωδίου για τις προνύμφες μέσω υδατικών και διατροφικών πόρων, σε συνδυασμό. Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν εμπειρικές κατευθυντήριες γραμμές σχετικά με τις ελάχιστες συγκεντρώσεις ιωδίου, είτε στην τροφή είτε στο νερό, που διασφαλίζουν σωστή ανάπτυξη. Ωστόσο, η διαθεσιμότητα του ιωδίου ενδέχεται να επηρεάσει την ανταπόκριση του θυρεοειδικού συστήματος σε παράγοντες που επιδρούν στον θυρεοειδή και είναι γνωστό ότι επιδρά στο βασικό επίπεδο λειτουργίας του θυρεοειδούς αδένος, μια πτυχή στην οποία πρέπει να δίνεται προσοχή κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της ιστοπαθολογικής εξέτασης του θυρεοειδούς. Με βάση προηγούμενες μελέτες, έχει αποδειχθεί ότι η δοκιμασία αποδίδει ικανοποιητικά όταν οι συγκεντρώσεις ιωδίου (I^-) στο νερό αραίωσης κυμαίνονται μεταξύ 0,5 και 10 $\mu\text{g/l}$. Ιδανικά, η ελάχιστη συγκέντρωση ιωδίου στο νερό αραίωσης σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής θα πρέπει να είναι 0,5 $\mu\text{g/l}$ (με προσθήκη ιόντων ιωδίου σε μορφή άλατος με νάτριο ή κάλιο). Σε περίπτωση ανασύστασης του νερού δοκιμής από απιονισμένο νερό, θα πρέπει να προστίθεται ιώδιο σε ελάχιστη συγκέντρωση 0,5 $\mu\text{g/l}$. Η μετρούμενη συγκέντρωση ιωδίου στο νερό δοκιμής (δηλ. στο νερό αραίωσης) και η συμπλήρωση του νερού δοκιμής με ιώδιο ή άλλα άλατα (εφόσον χρησιμοποιούνται) θα πρέπει να δηλώνονται στην έκθεση. Η περιεκτικότητα σε ιώδιο θα πρέπει να μετριέται και στις τροφές.

Σύστημα έκθεσης

18. Η δοκιμή σχεδιάστηκε με χρήση συστήματος αραιωτή συνεχούς ροής νερού. Τα εξαρτήματα του συστήματος θα πρέπει να περιλαμβάνουν εξαρτήματα που έρχονται σε επαφή με νερό κατασκευασμένα από γυαλί, ανοξείδωτο χάλυβα και/ή άλλα χημικώς αδρανή υλικά. Οι δεξαμενές έκθεσης θα πρέπει να είναι ενυδρεία από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα με ωφέλιμο όγκο δεξαμενής από 4,0 έως 10,0 l (ελάχιστο βάθος νερού από 10 έως 15 cm). Το σύστημα θα πρέπει να είναι σε θέση να υποστηρίζει όλες τις συγκεντρώσεις έκθεσης, έναν μάρτυρα και έναν μάρτυρα με διαλύτη, αν χρειάζεται, με τέσσερα πανομοιότυπα δείγματα ανά αγωγή και οκτώ στους μάρτυρες. Η ταχύτητα ροής σε κάθε δεξαμενή θα πρέπει να είναι σταθερή ώστε να διατηρούνται οι βιολογικές συνθήκες και η

έκθεση στις χημικές ουσίες. Συνιστάται οι ταχύτητες ροής να είναι κατάλληλες (π.χ. τουλάχιστον 5 κύκλοι ανανέωσης του νερού της δεξαμενής ανά ημέρα) προκειμένου να αποφεύγεται η μείωση των συγκεντρώσεων των χημικών ουσιών μέσω μεταβολισμού τόσο από τους οργανισμούς δοκιμής όσο και από τους μικροοργανισμούς του νερού που περιέχονται στα ενυδρεία, και μέσω αβιοτικών οδών αποδόμησης (υδρόλυση, φωτόλυση) ή διαφυγής (εξάτμιση, προσρόφηση). Οι δεξαμενές αγωγής θα πρέπει να κατανέμονται τυχαία σε μια θέση στο σύστημα έκθεσης, με σκοπό τη μείωση των πιθανών επιδράσεων που οφείλονται στη θέση, συμπεριλαμβανομένων των ελαφρών διακυμάνσεων στη θερμοκρασία, στην ένταση του φωτός κ.λπ. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη διαμόρφωση συστημάτων έκθεσης συνεχούς ροής νερού ανατρέξτε στον οδηγό του ASTM για τη διεξαγωγή δοκιμών οξείας τοξικότητας σε υλικά δοκιμών με ψάρια, μακροασπόνδυλα και αμφίβια (Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians) (16).

Παροχή της χημικής ουσίας: παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής

19. Για την παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής στο σύστημα έκθεσης, αποθεματικό διάλυμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να χορηγείται σταδιακά στο σύστημα έκθεσης μέσω κατάλληλης αντλίας ή άλλης συσκευής. Η ταχύτητα ροής του αποθεματικού διαλύματος θα πρέπει να βαθμονομείται σύμφωνα με την αναλυτική επιβεβαίωση των διαλυμάτων δοκιμής πριν από την έναρξη της έκθεσης και να υποβάλλεται σε περιοδικό ογκομετρικό έλεγχο κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Το διάλυμα δοκιμής σε κάθε υποδοχέα θα πρέπει να ανανεώνεται με ρυθμό τουλάχιστον 5 ανανεώσεων όγκου/ημέρα.
20. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο σύστημα μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητές της. Ως εκ τούτου, πριν από τη δοκιμή θα πρέπει να λαμβάνονται βασικές πληροφορίες για τη χημική ουσία που είναι ουσιώδεις για τον προσδιορισμό της ελεγχσιμότητάς της. Στις χρήσιμες πληροφορίες που είναι σχετικές με τις ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας συγκαταλέγονται ο συντακτικός τύπος, το μοριακό βάρος, η καθαρότητα, η σταθερότητα στο νερό και το φως, η pK_a και ο K_{ow} , η υδατοδιαλυτότητα (κατά προτίμηση στο δοκιμαστικό μέσο) και η τάση ατμών, καθώς και τα αποτελέσματα δοκιμής άμεσης βιοαποδομησιμότητας [μέθοδος δοκιμών Γ.4 (17) ή Γ.29 (18)]. Η υδατοδιαλυτότητα και η τάση ατμών μπορούν να χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της σταθεράς του νόμου του Henry, η οποία δείχνει αν είναι πιθανόν να σημειωθούν απώλειες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας λόγω εξάτμισης. Η διενέργεια της δοκιμής χωρίς τις πληροφορίες που παρατίθενται ανωτέρω θα πρέπει να αποτελεί αντικείμενο προσεκτικής εξέτασης καθώς ο σχεδιασμός της μελέτης εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και, χωρίς αυτά τα δεδομένα, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής μπορεί να είναι δύσκολη ή χωρίς νόημα. Πρέπει επίσης να υπάρχει αξιόπιστη αναλυτική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα διαλύματα, της

οποίας η ακρίβεια και το όρια ανίχνευσης να είναι γνωστά και δημοσιευμένα. Οι υδατοδιαλυτές υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν να διαλύονται σε ποσότητες νερού αραίωσης, σε συγκέντρωση που επιτρέπει την παροχή της χημικής ουσίας στην επιδιωκόμενη συγκέντρωση δοκιμής σε σύστημα συνεχούς ροής νερού. Οι χημικές ουσίες που είναι υγρές ή στερεές σε θερμοκρασία δωματίου και οι οποίες είναι μέτρια διαλυτές στο νερό μπορούν να εισάγονται με τη χρήση μεθόδων κορεσμού υγρού:υγρό ή υγρού:στερεό (π.χ. στήλη υαλοβάμβακα) (19). Αν και μπορεί να είναι επίσης δυνατή η χορήγηση εξαιρετικά υδρόφοβων υπό δοκιμή χημικών ουσιών μέσω της τροφής, η εμπειρία στη χρήση αυτής της οδού έκθεσης σε αυτή τη δοκιμασία είναι μικρή.

21. Τα διαλύματα με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις παρασκευάζονται συνήθως με αραίωση αποθεματικού διαλύματος. Το αποθεματικό διάλυμα θα πρέπει, κατά προτίμηση, να παρασκευάζεται με απλή ανάμειξη ή ανακίνηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε νερό αραίωσης, με μηχανικά μέσα (π.χ. ανάδευση και/ή υπερήχους). Για να επιτευχθεί κατάλληλα πυκνό αποθεματικό διάλυμα, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν στήλες/συστήματα κορεσμού ή παθητικές δοσιμετρικές μέθοδοι (20). Προτιμώνται τα συστήματα δοκιμής χωρίς συνδιαλύτη, ωστόσο οι διάφορες υπό δοκιμή χημικές ουσίες έχουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, οι οποίες πιθανώς να απαιτούν διαφορετικές προσεγγίσεις όσον αφορά την προετοιμασία του νερού έκθεσης στη χημική ουσία. Είναι προτιμότερο να καταβάλλεται προσπάθεια αποφυγής της χρήσης διαλυτών ή φορέων επειδή: 1) ορισμένοι διαλύτες ενδέχεται να συνεπάγονται οι ίδιοι τοξικότητα και/ή ανεπιθύμητες ή απρόβλεπτες αποκρίσεις, 2) η διεξαγωγή δοκιμών με χημικές ουσίες σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από την υδατοδιαλυτότητά τους (όπως συμβαίνει συχνά όταν χρησιμοποιούνται διαλύτες) μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα ανακριβείς προσδιορισμούς των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων, (3) η χρήση διαλυτών σε μακροπρόθεσμες δοκιμές μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τον σημαντικό σχηματισμό βιοϋμένων, ο οποίος σχετίζεται με μικροβιακή δραστηριότητα που μπορεί να επηρεάσει τις περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς και την ικανότητα διατήρησης των συγκεντρώσεων έκθεσης, και (4) ελλείψει ιστορικών δεδομένων που να καταδεικνύουν ότι ο διαλύτης δεν επηρεάζει την έκβαση της μελέτης, η χρήση διαλυτών απαιτεί αγωγή μάρτυρα με διαλύτη η οποία έχει επιπτώσεις στην καλή μεταχείριση των ζώων, δεδομένου ότι απαιτείται πρόσθετος αριθμός ζώων για τη διεξαγωγή της δοκιμής. Για χημικές ουσίες που παρουσιάζουν δυσκολίες στη δοκιμή, μπορεί να χρησιμοποιείται διαλύτης ως έσχατη λύση· συμβουλευτείτε το έγγραφο κατευθυντήριων γραμμών του ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές υδατικής τοξικότητας δύσκολων ουσιών και μειγμάτων (OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures) (15) για την επιλογή της βέλτιστης μεθόδου. Η επιλογή του διαλύτη θα καθορίζεται από τις χημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και τη διαθεσιμότητα ιστορικών δεδομένων για τους μάρτυρες σχετικά με τον διαλύτη. Εάν δεν υπάρχουν ιστορικά δεδομένα, η καταλληλότητα ενός διαλύτη θα πρέπει να προσδιορίζεται πριν από τη διενέργεια της οριστικής μελέτης. Εάν δεν μπορεί να

αποφευχθεί η χρήση διαλύτη και προκύψει μικροβιακή δραστηριότητα (σχηματισμός βιοϋμένων), συνιστάται η καταγραφή και η αναφορά του σχηματισμού βιοϋμένων ανά δεξαμενή (τουλάχιστον σε εβδομαδιαία βάση) σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Ιδανικά, η συγκέντρωση του διαλύτη θα πρέπει να διατηρείται σταθερή στον μάρτυρα με διαλύτη και σε όλες τις αγωγές της δοκιμής. Εάν η συγκέντρωση του διαλύτη δεν διατηρηθεί σταθερή, στον μάρτυρα με διαλύτη θα πρέπει να χρησιμοποιείται η υψηλότερη συγκέντρωση διαλύτη στην αγωγή της δοκιμής. Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται διαλύτης ως φορέας, οι μέγιστες συγκεντρώσεις του διαλύτη δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τα 100 μl/l ή τα 100 mg/l (21), και συνιστάται η συγκέντρωση του διαλύτη να είναι όσον το δυνατόν πιο χαμηλή (π.χ. ≤ 20 μl/l) για να αποφεύγονται πιθανές επιδράσεις του διαλύτη στις μετρούμενες παραμέτρους (22).

Πειραματόζωα

Είδος δοκιμής

22. Το είδος της δοκιμής είναι το *X. laevis* διότι: 1) καλλιεργείται συστηματικά σε εργαστήρια παγκοσμίως, 2) αποκτάται εύκολα από προμηθευτές του εμπορίου και 3) είναι δυνατός ο προσδιορισμός του γενετικού φύλου.

Φροντίδα και αναπαραγωγή ενήλικων ατόμων

23. Η δέουσα φροντίδα και αναπαραγωγή των ατόμων *X. laevis* περιγράφεται στις σχετικές τυποποιημένες κατευθυντήριες γραμμές (23). Η στέγαση και η φροντίδα των ατόμων *X. laevis* περιγράφεται επίσης από τον Read (24). Για την πρόκληση αναπαραγωγής, χορηγείται ενδοπεριτοναϊκώς ένεση ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) σε τρία έως πέντε ζεύγη θηλυκών και αρσενικών ενήλικων ατόμων. Στα θηλυκά και αρσενικά άτομα χορηγούνται με ένεση περίπου 800-1 000 IU και 500-800 IU hCG διαλυμένης σε αλατούχο διάλυμα 0,6-0,9 % (ή σε διάλυμα Ringer βατράχου, ένα ισοτονικό αλατούχο διάλυμα για χρήση σε αμφίβια, www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html). Ο όγκος έγχυσης θα πρέπει να είναι περίπου 10 μl/g σωματικού βάρους (~1000 μl). Εν συνεχεία, τα ζεύγη στα οποία έχει προκληθεί αναπαραγωγή διατηρούνται σε μεγάλες δεξαμενές ανενόχλητα και κάτω από στατικές συνθήκες, για την προώθηση του ζευγαρώματος. Στον πυθμένα κάθε δεξαμενής αναπαραγωγής θα πρέπει να υπάρχει ένας ψευδοπυθμένας από πλέγμα ανοξείδωτου χάλυβα (π.χ. με μάτια 1,25 cm) που να επιτρέπει στις μάζες των αυγών να αποτίθενται στον πυθμένα. Οι βάτραχοι που θα δεχτούν ένεση hCG αργά το απόγευμα συνήθως εναποθέτουν τα περισσότερα αυγά μέχρι αργά το πρωί της επόμενης ημέρας. Μετά την απελευθέρωση και γονιμοποίηση επαρκούς ποσότητας αυγών, τα ενήλικα άτομα θα πρέπει να απομακρύνονται από τις δεξαμενές αναπαραγωγής. Εν συνεχεία τα αυγά συλλέγονται και τα ζελατινώδη περιβλήματα αφαιρούνται με χρήση L-κυστεΐνης (23). Θα πρέπει να παρασκευάζεται διάλυμα περιεκτικότητας 2 % σε L-κυστεΐνη και το pH να

ρυθμίζεται σε 8,1 με προσθήκη 1 M NaOH. Αυτό το διάλυμα θερμοκρασίας 21 °C προστίθεται σε φιάλη Erlenmeyer 500 ml που περιέχει τα αυγά που προέρχονται από μία διαδικασία ωοτοκίας, περιδινίζεται ήπια για ένα έως δύο λεπτά και εν συνεχεία εκπλένεται σχολαστικά 6-8 φορές με νερό καλλιέργειας θερμοκρασίας 21 °C. Εν συνεχεία τα αυγά μεταφέρονται σε δοχείο κρυστάλλωσης και επιβεβαιώνεται ότι είναι βιώσιμα σε ποσοστό > 70 % με ελάχιστες ανωμαλίες στα έμβρυα που παρουσιάζουν κυτταρική διαίρεση

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Συγκεντρώσεις δοκιμής

24. Συνιστάται η χρήση τουλάχιστον τεσσάρων συγκεντρώσεων χημικής ουσίας και κατάλληλων μαρτύρων (συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων με διαλύτη, εάν είναι απαραίτητο). Γενικά, συνιστάται διαχωρισμός συγκέντρωσης (συντελεστής απόστασης) που δεν υπερβαίνει το 3,2.
25. Για τους σκοπούς της παρούσας δοκιμής, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται, στο μέτρο του δυνατού, τα αποτελέσματα από τις υπάρχουσες μελέτες σχετικά με τα αμφίβια για τον προσδιορισμό της υψηλότερης συγκέντρωσης δοκιμής, ώστε να αποφεύγονται οι υπερβολικά τοξικές συγκεντρώσεις. Πληροφορίες π.χ. από ποσοτικές σχέσεις δομής-δραστικότητας, από συγκριτικές μελέτες και από υπάρχουσες μελέτες σε αμφίβια, όπως η δοκιμασία μεταμόρφωσης αμφιβίων (μέθοδος δοκιμών Γ.38) (25) και η δοκιμασία τερατογένεσης σε έμβρυο βατράχου - *Xenopus* (23) και/ή δοκιμασίες σε ψάρια όπως οι μέθοδοι δοκιμών Γ.48, Γ.41 και Γ.49 (26) (27) (28), μπορούν να συμβάλουν στον προσδιορισμό αυτής της συγκέντρωσης. Πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμασίας LAGDA, μπορεί να διενεργηθεί πείραμα προσδιορισμού εύρους. Συνιστάται η έκθεση προσδιορισμού εύρους να ξεκινά εντός 24 ωρών από τη γονιμοποίηση και να συνεχίζεται για 7-14 ημέρες (ή περισσότερες, εάν χρειάζεται) και οι συγκεντρώσεις δοκιμής να ρυθμίζονται έτσι ώστε οι συγκεντρώσεις δοκιμής να μην απέχουν μεταξύ τους κατά συντελεστή μεγαλύτερο του 10. Τα αποτελέσματα του πειράματος προσδιορισμού εύρους θα πρέπει να χρησιμεύουν για τον καθορισμό της υψηλότερης συγκέντρωσης δοκιμής στη δοκιμασία LAGDA. Να σημειωθεί ότι εάν πρέπει να χρησιμοποιηθεί διαλύτης, τότε η καταλληλότητα του διαλύτη (δηλαδή εάν μπορεί να έχει αντίκτυπο στο αποτέλεσμα της μελέτης) θα μπορούσε να καθοριστεί ως μέρος της μελέτης προσδιορισμού εύρους.

Πανομοιότυπα δείγματα εντός των ομάδων αγωγής και των μαρτύρων

26. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τέσσερις δεξαμενές πανομοιότυπων δειγμάτων ανά συγκέντρωση δοκιμής και τουλάχιστον οκτώ πανομοιότυπα δείγματα για τους μάρτυρες (και τον μάρτυρα με διαλύτη, αν χρειάζεται) (δηλαδή ο αριθμός πανομοιότυπων δειγμάτων στον μάρτυρα και τυχόν μάρτυρα με διαλύτη θα πρέπει να είναι διπλάσιος από τον αριθμό πανομοιότυπων δειγμάτων κάθε ομάδας αγωγής, για να

εξασφαλιστεί η κατάλληλη στατιστική ισχύς). Κάθε πανομοιότυπο δείγμα δεν πρέπει να περιέχει περισσότερα από 20 ζώα. Ο ελάχιστος αριθμός ζώων που υποβάλλονται σε επεξεργασία θα είναι 15 (5 για το υποδείγμα στο στάδιο 62 κατά NF και 10 νεαρά άτομα). Ωστόσο, επιπλέον ζώα προστίθενται σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα για να συνυπολογισθεί η θνησιμότητα και να διατηρηθεί ο κρίσιμος αριθμός 15.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Επισκόπηση δοκιμασίας

27. Η δοκιμασία ξεκινά με πρόσφατα έμβρυα (στάδια 8-10 κατά NF) και συνεχίζεται κατά το στάδιο της ανάπτυξης των νεαρών ατόμων. Τα ζώα εξετάζονται καθημερινά για θνησιμότητα και τυχόν σημεία μη φυσιολογικής συμπεριφοράς. Στο στάδιο 62 κατά NF, συλλέγεται υποδείγμα προνυμφών (μέχρι 5 ζώα ανά πανομοιότυπο δείγμα) και εξετάζονται διάφορες παράμετροι (πίνακας 1). Αφού φτάσουν όλα τα ζώα στο στάδιο 66 κατά NF, δηλαδή μετά την ολοκλήρωση της μεταμόρφωσης (ή 70 ημέρες μετά την έναρξη της δοκιμασίας, όποιο από τα δύο προηγείται), θανατώνονται τυχαία (αλλά χωρίς λήψη υποδείγματος) ορισμένα ζώα ώστε να μειωθεί ο αριθμός τους (10 ανά δεξαμενή) (βλ. παράγραφο 43) και συνεχίζεται η έκθεση των υπόλοιπων ζώων μέχρι να παρέλθουν 10 εβδομάδες από τον διάμεσο χρόνο έως το στάδιο 62 κατά NF στον μάρτυρα. Στο τέλος της δοκιμής (δειγματοληψία νεαρών ζώων) πραγματοποιούνται επιπλέον μετρήσεις (πίνακας 1).

Συνθήκες έκθεσης

28. Πλήρης σύνοψη των παραμέτρων της δοκιμής διατίθεται στο προσάρτημα 3. Κατά την περίοδο έκθεσης, το διαλυμένο οξυγόνο, η θερμοκρασία και το pH των διαλυμάτων δοκιμής θα πρέπει να μετρώνται καθημερινά. Η αγωγιμότητα, η αλκαλικότητα και η σκληρότητα μετρώνται μία φορά τον μήνα. Για τη θερμοκρασία νερού των διαλυμάτων δοκιμής, οι διαφορές μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων / μεταξύ των αγωγών (εντός μίας ημέρας) δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τον 1,0 °C. Επίσης, για το pH των διαλυμάτων δοκιμής, οι διαφορές μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων / μεταξύ των αγωγών δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν το 0,5.
29. Οι δεξαμενές έκθεσης μπορούν να καθαρίζονται καθημερινά με σифονισμό για την απομάκρυνση υπολειμμάτων τροφών και αποβλήτων, με προσοχή ώστε να αποφεύγεται η διασταυρούμενη μόλυνση των δεξαμενών. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να ελαχιστοποιείται η πρόκληση στρες και τραυματισμών στα ζώα, ιδιαίτερα κατά τη μετακίνηση, τον καθαρισμό των ενυδρείων και τον χειρισμό. Θα πρέπει να αποφεύγονται οι συνθήκες/δραστηριότητες που προκαλούν στρες, όπως ο δυνατός και/ή αδιάκοπος θόρυβος, τα ελαφριά χτυπήματα στα ενυδρεία ή οι κραδασμοί μέσα στη δεξαμενή.

Διάρκεια έκθεσης στην υπό δοκιμή χημική ουσία

30. Η έκθεση ξεκινάει σε πρόσφατα έμβρυα (σταδίου 8-10 κατά NF) και συνεχίζεται μέχρι να παρέλθουν δέκα εβδομάδες από τον διάμεσο χρόνο έως το στάδιο 62 κατά NF (≤ 45 ημέρες από την έναρξη της δοκιμασίας) στην ομάδα μάρτυρα. Γενικά, η διάρκεια της δοκιμασίας LAGDA είναι 16 εβδομάδες (17 εβδομάδες κατά μέγιστο).

Έναρξη δοκιμασίας

31. Όσον αφορά τα γονικά ζώα που χρησιμοποιούνται για την έναρξη της δοκιμασίας, θα πρέπει να αποδειχθεί προηγουμένως ότι παράγουν απογόνους των οποίων το φύλο μπορεί να προσδιοριστεί γενετικά (προσάρτημα 5). Μετά την ωτοκία των ενηλίκων, τα έμβρυα συλλέγονται, υποβάλλονται σε επεξεργασία με κυστεΐνη για την απομάκρυνση του ζελατινώδους περιβλήματος και ελέγχονται ως προς τη βιωσιμότητα (23). Η επεξεργασία με κυστεΐνη επιτρέπει τον χειρισμό των εμβρύων κατά το στάδιο της διαλογής χωρίς αυτά να προσκολλώνται σε επιφάνειες. Η διαλογή πραγματοποιείται μέσω στερεοσκοπικού μικροσκοπίου με χρήση σταγονόμετρου κατάλληλου μεγέθους για την απομάκρυνση των μη βιώσιμων εμβρύων. Είναι προτιμότερο να χρησιμοποιείται για τη δοκιμή μια ωτοκία που έχει βιωσιμότητα μεγαλύτερη από 70 %. Τα έμβρυα σταδίου 8-10 κατά NF κατανέμονται τυχαία σε δεξαμενές αγωγής έκθεσης που περιέχουν κατάλληλο όγκο νερού αραίωσης, έτσι ώστε η κάθε δεξαμενή να περιέχει 20 έμβρυα. Ο χειρισμός των εμβρύων κατά τη διάρκεια αυτής της μεταφοράς θα πρέπει να πραγματοποιείται με προσοχή, ώστε να ελαχιστοποιείται η πρόκληση στρες λόγω του χειρισμού και να αποφεύγονται τυχόν τραυματισμοί. 96 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, οι γυρίνοι θα πρέπει να έχουν ανέλθει στη στήλη ύδατος και να έχουν αρχίσει να προσκολλώνται στα τοιχώματα της δεξαμενής.

Πρόγραμμα σίτισης

32. Η τροφή και η αλλαγή του ρυθμού σίτισης κατά τα διάφορα στάδια ζωής του *X. laevis* αποτελούν πολύ σημαντική πτυχή του πρωτοκόλλου LAGDA. Η υπερβολική σίτιση κατά το προνυμφικό στάδιο προκαλεί κατά κανόνα αύξηση της επίπτωσης και της σοβαρότητας της σκολίωσης (προσάρτημα 8) και θα πρέπει να αποφεύγεται. Αντιθέτως, η ελλιπής σίτιση κατά το προνυμφικό στάδιο προκαλεί ιδιαίτερα μεταβλητούς ρυθμούς ανάπτυξης στους μάρτυρες και ενδέχεται να μειώσει τη στατιστική ισχύ ή να επιδράσει συγχυτικά στα αποτελέσματα της δοκιμής. Στο προσάρτημα 4 περιγράφεται η συνιστώμενη διατροφή και τα προγράμματα σίτισης για τις προνύμφες και τα νεαρά άτομα του *X. laevis* σε συνθήκες συνεχούς ροής, ωστόσο επιτρέπονται εναλλακτικές λύσεις με την προϋπόθεση ότι οι οργανισμοί δοκιμής αυξάνονται και αναπτύσσονται ικανοποιητικά. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, εάν εξετάζονται παράμετροι που αφορούν το ενδοκρινικό σύστημα, η τροφή δεν θα πρέπει να περιέχει ουσίες που επιδρούν στο ενδοκρινικό σύστημα, όπως άλευρο σόγιας.

Σίτιση των προνυμφών

33. Το συνιστώμενο σιτηρέσιο των προνυμφών περιλαμβάνει αρχικές τροφές για πέστροφες, δισκία φυκών *Spirulina* και νιφάδες για χρυσόψαρα (π.χ. νιφάδες TetraFin®, Tetra, Γερμανία) αναμεμιγμένα σε νερό καλλιέργειας (ή αραίωσης). Το μείγμα αυτό χορηγείται τρεις φορές ημερησίως τις καθημερινές και μία φορά ημερησίως τα Σαββατοκύριακα. Στους γυρίνους χορηγούνται επίσης ζωντανές γαρίδες της άλμης (ναύπλιοι *Artemia* spp. ηλικίας 24 ωρών), δύο φορές ημερησίως τις καθημερινές και μία φορά ημερησίως τα Σαββατοκύριακα, αρχίζοντας την 8η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση. Η σίτιση των προνυμφών, η οποία πρέπει να είναι σταθερή σε κάθε δοκιμαστικό δοχείο, θα πρέπει να επιτρέπει την κατάλληλη αύξηση και ανάπτυξη των ζώων δοκιμής προκειμένου να διασφαλίζεται η αναπαραγωγικότητα και η δυνατότητα μεταφοράς των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας: 1) ο διάμεσος χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF στους μάρτυρες θα πρέπει να είναι ≤ 45 ημέρες και 2) συνιστάται το μέσο βάρος έως το στάδιο 62 κατά NF να είναι εντός του ορίου $1,0 \pm 0,2$ g στους μάρτυρες.

Σίτιση των νεαρών ατόμων

34. Αφού ολοκληρωθεί η μεταμόρφωση, το πρόγραμμα σίτισης περιλαμβάνει υψηλής ποιότητας βυθιζόμενη τροφή βατράχων, π.χ. Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, ΗΠΑ) (προσάρτημα 4). Για τα πρώιμα νεαρά άτομα, οι κόκκοι αλέθονται για σύντομο χρονικό διάστημα σε συσκευή άλεσης καφέ ή αναμικτήρα ή συνθλίβονται σε γουδί προκειμένου να μειωθεί το μέγεθός τους. Αφού τα νεαρά άτομα μεγαλώσουν αρκετά ώστε να μπορούν να καταναλώνουν πλήρεις κόκκους, δεν χρειάζεται πια άλεση ή σύνθλιψη. Τα ζώα θα πρέπει να σιτίζονται μία φορά ημερησίως. Η σίτιση των νεαρών ατόμων θα πρέπει να επιτρέπει την κατάλληλη αύξηση και ανάπτυξη των οργανισμών: συνιστάται μέσο βάρος εντός του ορίου $11,5 \pm 3$ g στα νεαρά άτομα μάρτυρες κατά τη λήξη της δοκιμασίας.

Αναλυτική χημεία

35. Πριν από την έναρξη της δοκιμασίας, θα πρέπει να προσδιορίζεται η σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ., διαλυτότητα, ικανότητα αποδόμησης και πτητικότητα) και να επιλέγονται οι απαραίτητες αναλυτικές μέθοδοι, π.χ. βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών ή γνώσεων. Όταν η δόση χορηγείται μέσω του νερού αραίωσης, συνιστάται, πριν από την έναρξη της δοκιμής, να αναλύονται τα διαλύματα δοκιμής από κάθε δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος, προκειμένου να επαληθεύονται οι επιδόσεις του συστήματος. Στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης, οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας προσδιορίζονται ανά κατάλληλα χρονικά διαστήματα, κατά προτίμηση κάθε εβδομάδα για τουλάχιστον ένα πανομοιότυπο δείγμα σε κάθε ομάδα αγωγής, με κυκλική εναλλαγή μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων της ίδιας ομάδας αγωγής κάθε εβδομάδα. Συνιστάται να βασίζονται τα αποτελέσματα σε μετρηθείσες συγκεντρώσεις. Ωστόσο, εάν η

συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα έχει διατηρηθεί ικανοποιητικά εντός του $\pm 20\%$ της ονομαστικής συγκέντρωσης καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής, τα αποτελέσματα μπορούν να βασίζονται στις ονομαστικές ή στις μετρηθείσες τιμές. Επίσης, ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV) των μετρούμενων συγκεντρώσεων δοκιμής καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής σε μία αγωγή θα πρέπει να διατηρείται εντός του ορίου του 20 % ή λιγότερο σε κάθε συγκέντρωση. Όταν οι μετρούμενες συγκεντρώσεις δεν διατηρούνται εντός του ορίου 80-120 % της ονομαστικής συγκέντρωσης (για παράδειγμα, κατά την υποβολή σε δοκιμή χημικών ουσιών με υψηλή ικανότητα αποδόμησης ή προσρόφησης), οι αποτελεσματικές συγκεντρώσεις θα πρέπει να προσδιορίζονται και να εκφράζονται σε σχέση με την αριθμητική μέση συγκέντρωση για τις δοκιμές συνεχούς ροής.

36. Οι ρυθμοί ροής του νερού αραίωσης και του αποθεματικού διαλύματος θα πρέπει να ελέγχονται ανά κατάλληλα χρονικά διαστήματα (π.χ. τρεις φορές την εβδομάδα) καθ' όλη τη διάρκεια της έκθεσης. Σε περιπτώσεις χημικών ουσιών που δεν μπορούν να ανιχνευτούν σε ορισμένες ή σε όλες τις ονομαστικές συγκεντρώσεις, (π.χ. λόγω ταχείας αποδόμησης ή προσρόφησης στα δοκιμαστικά δοχεία, ή λόγω έντονης συσσώρευσης στο σώμα των εκτιθέμενων ζώων), συνιστάται ο ρυθμός ανανέωσης του διαλύματος δοκιμής σε κάθε θάλαμο να προσαρμόζεται ώστε να διατηρούνται οι συγκεντρώσεις δοκιμής όσο το δυνατόν πιο σταθερές.

Παρατηρήσεις και μετρήσεις παραμέτρων

37. Οι παράμετροι που αξιολογούνται στη διάρκεια της έκθεσης είναι εκείνες που είναι ενδεικτικές της τοξικότητας, περιλαμβανομένης της θνησιμότητας, της μη φυσιολογικής συμπεριφοράς, όπως κλινικά σημεία ασθένειας και/ή γενικές τοξικότητες, και των προσδιορισμών της σωματικής αύξησης (μήκος και βάρος), καθώς και παράμετροι παθολογίας οι οποίες ενδέχεται να αντιδρούν τόσο στη γενική τοξικότητα όσο και στους ενδοκρινικούς τρόπους δράσης που πλήττουν οδούς που διαμεσολαβούνται από οιστρογόνα, ανδρογόνα ή θυρεοειδικές ορμόνες. Επιπλέον, κατά τη λήξη της δοκιμασίας μπορεί να μετράται προαιρετικά η συγκέντρωση της VTG στο πλάσμα. Η μέτρηση της VTG μπορεί να είναι χρήσιμη για την κατανόηση των αποτελεσμάτων της μελέτης στο πλαίσιο ενδοκρινικών μηχανισμών για εικαζόμενους ενδοκρινικούς διαταράκτες. Οι παράμετροι και το χρονοδιάγραμμα μετρήσεων συνοψίζονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1: Επισκόπηση παραμέτρων της LAGDA

Παράμετροι*	Καθημερινά	Ενδιάμεση δειγματοληψία (δειγματοληψία προνυμφών)	Λήξη της δοκιμής (δειγματοληψία νεαρών ατόμων)
Θνησιμότητα και ανωμαλίες	X		

Χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF		X	
Ιστο(παθο)λογία (θυρεοειδής αδένας)		X	
Μορφομετρικά στοιχεία (σωματική αύξηση: βάρος και μήκος)		X	X
Ηπατοσωματικός δείκτης (LSI)			X
Αναλογίες γενετικών/φαινοτυπικών φύλων			X
Ιστοπαθολογία (γονάδες, αναπαραγωγικοί πόροι, νεφρός και ήπαρ)			X
Λεκιθογενίνη (VTG) (προαιρετικά)			X

* Όλες οι παράμετροι υποβάλλονται σε στατιστική ανάλυση.

Θνησιμότητα και καθημερινές παρατηρήσεις

38. Όλες οι δεξαμενές δοκιμής θα πρέπει να ελέγχονται καθημερινά για νεκρά ζώα και θα πρέπει να καταγράφονται οι τιμές θνησιμότητας για κάθε δεξαμενή. Τα νεκρά ζώα θα πρέπει να απομακρύνονται από τη δεξαμενή δοκιμής αμέσως μόλις γίνονται αντιληπτά. Θα πρέπει να κατηγοριοποιείται το αναπτυξιακό στάδιο των νεκρών ζώων είτε ως «προ σταδίου 58 κατά NF» (πριν από την εμφάνιση του πρόσθιου άκρου), ως «στάδιο 58 κατά NF έως στάδιο 62 κατά NF», ως «στάδιο 63 κατά NF έως στάδιο 66 κατά NF» (μεταξύ σταδίου 62 κατά NF και πλήρους απορρόφησης της ουράς), ή ως «μετά το στάδιο 66 κατά NF» (μετά το στάδιο της προνύμφης). Τιμές θνησιμότητας που υπερβαίνουν το 20 % ενδέχεται να υποδεικνύουν ακατάλληλες συνθήκες δοκιμής ή έκδηλες τοξικές επιδράσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Τα ζώα είναι συνήθως πιο επιρρεπή στον θάνατο από άλλες αιτίες εκτός των χημικών ουσιών κατά τις πρώτες ημέρες της ανάπτυξης μετά την ωοτοκία και κατά την κορύφωση της μεταμόρφωσης. Η θνησιμότητα μπορεί να διαπιστωθεί από τα δεδομένα για τους μάρτυρες.
39. Επιπλέον, τυχόν παρατήρηση μη φυσιολογικής συμπεριφοράς, μακροσκοπικά ορατών δυσπλασιών (π.χ. σκολίωση), ή αλλοιώσεων θα πρέπει να καταγράφεται. Οι παρατηρήσεις σκολίωσης θα πρέπει να μετρώνται (συχνότητα εμφάνισης) και να διαβαθμίζονται ως προς τη σοβαρότητα (π.χ. μη αξιοσημείωτη: NR, ελάχιστη: 1, μέτρια: 2, σοβαρή: 3 – βλ. προσάρτημα 8). Θα πρέπει να καταβάλλονται προσπάθειες ώστε να περιορίζεται ο επιπολασμός της μέτριας και σοβαρής σκολίωσης (π.χ. κάτω του 10 % στους μάρτυρες) καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, αν και η ύπαρξη υψηλότερου επιπολασμού ανωμαλιών δεν θα πρέπει να αποτελεί απαραίτητως λόγο διακοπής της δοκιμής. Η φυσιολογική συμπεριφορά των προνυμφών χαρακτηρίζεται από αιώρηση στη στήλη ύδατος με την ουρά σηκωμένη πάνω από το κεφάλι, τακτικό και ρυθμικό χτύπημα του ουραίου περυγίου, περιοδική ανάδυση στην επιφάνεια του νερού, ανοιγοκλείσιμο των επικαλυμμάτων των βραγχίων, και αντίδραση σε ερεθίσματα. Μη φυσιολογικές συμπεριφορές μπορεί να

περιλαμβάνουν, για παράδειγμα, επίπλευση στην επιφάνεια, παραμονή στον πυθμένα της δεξαμενής, ανεστραμμένη ή ακανόνιστη κολύμβηση, έλλειψη δραστηριότητας ανάδυσης και αδυναμία αντίδρασης σε ερεθίσματα. Για τα ζώα που έχουν ολοκληρώσει το στάδιο της μεταμόρφωσης, πέραν των προαναφερθεισών μη φυσιολογικών συμπεριφορών, θα πρέπει να καταγράφονται τυχόν σημαντικές διαφορές στην κατανάλωση τροφής μεταξύ των αγωγών. Μακροσκοπικές δυσπλασίες και αλλοιώσεις είναι, μεταξύ άλλων, οι μορφολογικές ανωμαλίες (π.χ. παραμορφώσεις άκρων), οι αιμορραγικές βλάβες, το οίδημα της κοιλίας και οι λοιμώξεις από βακτήρια ή μύκητες. Η εμφάνιση αλλοιώσεων στο κεφάλι των νεαρών ατόμων, ακριβώς πίσω από τα ρουθούνια, μπορεί να αποτελεί ένδειξη ανεπαρκών επιπέδων υγρασίας. Οι προσδιορισμοί αυτοί είναι ποιοτικοί και θα πρέπει να θεωρούνται παρόμοιοι με κλινικά σημεία ασθένειας/στρες, καθώς και να γίνονται σε σύγκριση με τα ζώα-μάρτυρες. Εάν η συχνότητα εμφάνισής τους είναι μεγαλύτερη στις δεξαμενές έκθεσης σε σχέση με τους μάρτυρες, θα πρέπει να θεωρούνται ενδείξεις έκδηλης τοξικότητας.

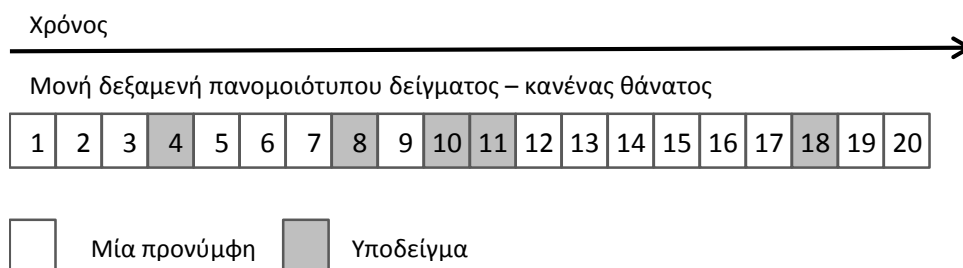
Δειματοληψία υποδειγμάτων προνυμφών

Συνοπτική περιγραφή της δειματοληψίας υποδειγμάτων προνυμφών:

40. Οι γυρίνοι που φθάνουν στο στάδιο 62 κατά NF θα πρέπει είτε να απομακρύνονται από τις δεξαμενές και κατόπιν να υποβάλλονται σε δειματοληψία ή να μετακινούνται σε νέα δεξαμενή για τη διεξαγωγή της επόμενης φάσης έκθεσης, είτε να διαχωρίζονται από τους εναπομείναντες γυρίνους στην ίδια δεξαμενή με διαχωριστικό. Οι γυρίνοι ελέγχονται καθημερινά, και καταγράφεται η ημέρα της μελέτης κατά την οποία ένας μεμονωμένος γυρίνος φθάνει στο στάδιο 62 κατά NF. Το καθοριστικό χαρακτηριστικό που χρησιμοποιείται στην εν λόγω αξιολόγηση είναι το σχήμα του κεφαλιού. Μόλις το μέγεθος του κεφαλιού μειωθεί σε τέτοιο βαθμό ώστε το πλάτος του να είναι οπτικά περίπου ίδιο με το πλάτος του κορμού του γυρίνου και του εμπρόσθιου άκρου στο επίπεδο του μέσου της καρδιάς, τότε θεωρείται ότι το συγκεκριμένο άτομο έχει φθάσει στο στάδιο 62 κατά NF.
41. Ο στόχος είναι η εξέταση συνολικά πέντε γυρίνων σταδίου 62 κατά NF ανά δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος. Η διαδικασία θα πρέπει να πραγματοποιείται απολύτως τυχαία, αλλά να αποφασίζεται εκ των προτέρων. Ένα υποθετικό παράδειγμα δεξαμενής πανομοιότυπου δείγματος παρέχεται στο **σχήμα 1**. Σε περίπτωση που σε μια συγκεκριμένη δεξαμενή υπάρχουν 20 επιβιώσαντες γυρίνοι όταν το πρώτο άτομο φθάσει στο στάδιο 62 κατά NF, θα πρέπει να επιλέγονται πέντε τυχαίοι αριθμοί μεταξύ 1 και 20. Ο γυρίνος αριθ. 1 είναι το πρώτο άτομο που φθάνει στο στάδιο 62 κατά NF και ο γυρίνος αριθ. 20 είναι το τελευταίο άτομο σε μια δεξαμενή που φθάνει το στάδιο 62 κατά NF. Παρομοίως, εάν σε μια δεξαμενή έχουν επιβιώσει 18 προνύμφες, θα πρέπει να επιλέγονται πέντε τυχαίοι αριθμοί μεταξύ 1 και 18. Η διαδικασία αυτή θα πρέπει να εκτελείται για κάθε δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος όταν το πρώτο άτομο υπό δοκιμή φθάνει στο στάδιο 62 κατά

NF. Εάν στη διάρκεια της δειγματοληψίας υπάρχουν θάνατοι ατόμων που φθάνουν στο στάδιο 62 κατά NF, τα δείγματα που απομένουν πρέπει να τυχαιοποιούνται εκ νέου ανάλογα με τον αριθμό των προνυμφών που έχουν απομείνει και οι οποίες δεν έχουν φθάσει στο στάδιο 62 κατά NF και ανάλογα με τον αριθμό επιπλέον δειγμάτων που απαιτείται προκειμένου να συμπληρωθούν συνολικά πέντε δείγματα από το συγκεκριμένο πανομοιότυπο δείγμα. Την ημέρα που ένας γυρίνος φθάνει στο στάδιο 62 κατά NF, θα πρέπει να καταγράφεται στον προετοιμασμένο πίνακα δειγματοληψίας το εάν το συγκεκριμένο άτομο υποβάλλεται σε εξέταση ή διαχωρίζεται από τους υπόλοιπους γυρίνους για τη συνέχιση της έκθεσης. Στο παρατιθέμενο παράδειγμα (σχήμα 1), το πρώτο άτομο που φθάνει στο στάδιο 62 κατά NF (δηλ. στο πλαίσιο #1) διαχωρίζεται από τις υπόλοιπες προνύμφες, συνεχίζει να υποβάλλεται σε έκθεση και καταγράφεται η ημέρα της μελέτης στην οποία το συγκεκριμένο άτομο έφθασε στο στάδιο 62 κατά NF. Επακολούθως, τα άτομα #2 και #3 υποβάλλονται στην ίδια διαδικασία με το άτομο #1 και, στη συνέχεια, το άτομο #4 υποβάλλεται σε εξέταση της σωματικής αύξησης και της ιστολογικής εικόνας του θυρεοειδούς (στο συγκεκριμένο παράδειγμα). Η διαδικασία συνεχίζεται μέχρις ότου το 20ο άτομο είτε προστεθεί στα υπόλοιπα άτομα μετά το στάδιο 62 κατά NF είτε υποβληθεί σε εξέταση. Η τυχαία διαδικασία που χρησιμοποιείται πρέπει να παρέχει την ίδια πιθανότητα επιλογής σε κάθε οργανισμό της δοκιμής. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με χρήση οποιασδήποτε μεθόδου τυχαιοποίησης, αλλά θα πρέπει επίσης κάθε γυρίνος να παγιδευτεί με απόχη σε κάποια χρονική στιγμή της περιόδου λήψης υποδειγμάτων σταδίου 62 κατά NF.

Σχήμα 1: Υποθετικό παράδειγμα συστήματος δειγματοληψίας σταδίου 62 κατά NF για μεμονωμένη δεξαμενή πανομοιότυπου δείγματος.



42. Για τη δειγματοληψία υποδείγματος προνυμφών, οι μετρούμενες παράμετροι είναι ακόλουθες: 1) χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF (δηλ. αριθμός ημερών μεταξύ της γονιμοποίησης και του σταδίου 62 κατά NF), 2) εξωτερικές ανωμαλίες, 3) μορφομετρικά στοιχεία (π.χ. βάρος και μήκος) και 4) ιστολογική εικόνα του θυρεοειδούς.

Θανάτωση γυρίνων

43. Το υποδείγμα γυρίνων σταδίου 62 κατά NF (5 άτομα ανά πανομοιότυπο δείγμα) θα πρέπει να θανατώνεται με ευθανασία μέσω εμβύθισης επί 30 λεπτά σε κατάλληλες ποσότητες (π.χ. 500 ml) αναισθητικού διαλύματος (π.χ. διάλυμα 0,3 % MS-222, μεθανοσουλφονικής τρικαΐνης, CAS.886-86-2). Στο διάλυμα MS-222 θα πρέπει να προστίθεται διττανθρακικό νάτριο για ρύθμιση του pH περίπου στο 7,0, διότι το διάλυμα MS-222 χωρίς ρυθμιστικό διάλυμα είναι όξινο και προκαλεί ερεθισμό στο δέρμα του βατράχου, με αποτέλεσμα κακή απορρόφηση και περιττό στρες.
44. Με χρήση απόχης, ένας γυρίνος απομακρύνεται από τον πειραματικό θάλαμο και μεταφέρεται (τοποθετείται) στο διάλυμα ευθανασίας. Το ζώο έχει θανατωθεί κατάλληλα και είναι έτοιμο για νεκροψία/νεκροτομή όταν δεν αντιδρά σε εξωτερικά ερεθίσματα, όπως το τσίμπημα του οπίσθιου άκρου με λαβίδα.

Μορφομετρικά στοιχεία (βάρος και μήκος)

45. Αμέσως μόλις ο γυρίνος σταματήσει να αντιδρά λόγω αναισθησίας, θα πρέπει να πραγματοποιούνται μετρήσεις του νωπού βάρους (με ακρίβεια χιλιοστόγραμμα) και του μήκους ρύγχους-αμάρας (SVL) (με ακρίβεια 0,1 χιλιοστόμετρου) κάθε γυρίνου (σχήμα 2α). Μπορεί να χρησιμοποιείται λογισμικό ανάλυσης εικόνας για τη μέτρηση του SVL από φωτογραφία. Προτού ζυγιστούν, οι γυρίνοι θα πρέπει να στεγνώνονται με απορροφητικό χαρτί ώστε να αφαιρείται τυχόν περίσσεια νερού. Μετά τις μετρήσεις του σωματικού μεγέθους (βάρος και SVL), θα πρέπει να καταγράφονται ή να σημειώνονται τυχόν μακροσκοπικές ανωμαλίες και/ή κλινικά σημεία τοξικότητας όπως σκολίωση (βλ. προσάρτημα 8), πετέχειες και αιμορραγία, η τεκμηρίωση των οποίων συνιστάται να γίνεται με ψηφιακά μέσα. Επισημαίνεται ότι οι πετέχειες είναι μικρές αιμορραγίες κόκκινου ή μωβ χρώματος στα τριχοειδή αγγεία του δέρματος.

Συλλογή και μονιμοποίηση ιστών

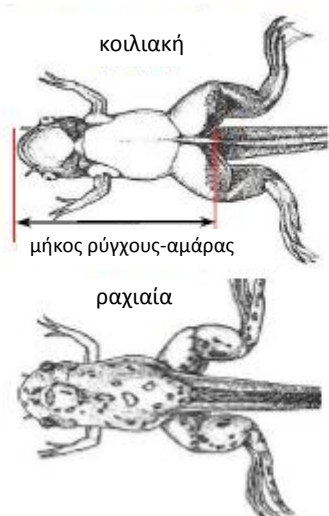
46. Για το υποδείγμα προνυμφών, αξιολογείται η ιστολογική εικόνα του θυρεοειδούς αδένος. Το κάτω τμήμα του κορμού που βρίσκεται πίσω από τα πρόσθια άκρα αφαιρείται και απορρίπτεται. Το υπόλοιπο σώμα μονιμοποιείται σε μέσο μονιμοποίησης Davidson. Ο όγκος του μέσου μονιμοποίησης στον περιέκτη θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερος του κατά προσέγγιση όγκου των ιστών. Θα πρέπει να διασφαλίζεται η κατάλληλη ανακίνηση ή κυκλοφορία του μέσου μονιμοποίησης προκειμένου να μονιμοποιούνται επαρκώς οι υπό μελέτη ιστοί. Όλοι οι ιστοί παραμένουν σε μέσο μονιμοποίησης Davidson επί τουλάχιστον 48 ώρες, αλλά όχι περισσότερο από 96 ώρες, οπότε και εκπλένονται με απιονισμένο νερό και φυλάσσονται σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης 10 % (1) (29).

Ιστολογία θυρεοειδούς

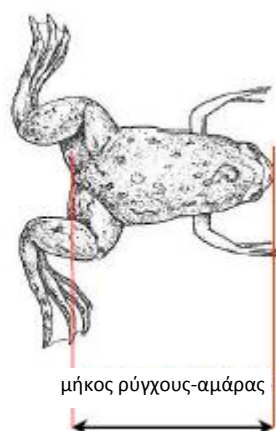
47. Αξιολογείται η ιστολογική εικόνα του θυρεοειδούς αδένος κάθε υποδείγματος προνυμφών (μονιμοποιημένοι ιστοί), δηλ. διάγνωση και αξιολόγηση σοβαρότητας (29) (30).

Σχήμα 2: Ορόσημα για τη μέτρηση του μήκους ρύγχους-αμάρας για τη LAGDA σε άτομα σταδίου 62 κατά NF 62 (α) και νεαρούς βατράχους (β). Τα καθοριστικά χαρακτηριστικά του σταδίου 62 κατά NF 62 (α) είναι τα ακόλουθα: το κεφάλι έχει το ίδιο πλάτος με τον κορμό, το μήκος του οσφρητικού νεύρου είναι μικρότερο από τη διάμετρο του οσφρητικού βολβού (ραχιαία όψη), και τα πρόσθια άκρα βρίσκονται στο επίπεδο της καρδιάς (κοιλιακή όψη). Εικόνες προσαρμοσμένες από Nieuwkoop και Faber (1994).

α. Υποδείγμα προνυμφών (στάδιο 62 NF)



β. Πριν την ενηλικίωση



Λήξη της έκθεσης των προνυμφών

48. Δεδομένου του αρχικού αριθμού των γυρίνων, αναμένεται ότι πιθανώς θα υπάρχει μικρό ποσοστό ατόμων που δεν θα αναπτυχθούν φυσιολογικά και δεν θα ολοκληρώσουν τη μεταμόρφωση (στάδιο 66 κατά NF) εντός εύλογου χρονικού διαστήματος. Το τμήμα της περιόδου έκθεσης των προνυμφών δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις 70 ημέρες. Τυχόν γυρίνοι που απομένουν κατά τη λήξη της περιόδου αυτής θα πρέπει να θανατώνονται με ευθανασία (βλ. παράγραφο 43), να εξετάζονται ως προς το νωπό βάρος και το SVL και να κατατάσσονται σε στάδιο κατά Nieuwkoop και Faber (1994), και τυχόν αναπτυξιακές ανωμαλίες θα πρέπει να σημειώνονται.

Επιλεκτική θανάτωση μετά το στάδιο 66 κατά NF

49. Δέκα άτομα ανά δεξαμενή θα πρέπει να συνεχίσουν από το στάδιο 66 κατά NF (πλήρης απορρόφηση της ουράς) μέχρι τη λήξη της έκθεσης. Ως εκ τούτου, αφού όλα τα ζώα φθάσουν στο στάδιο 66 κατά NF ή μετά από 70 ημέρες (όποιο από τα δύο συμβεί πρώτο), θα πρέπει να γίνει επιλεκτική θανάτωση κάποιων ατόμων. Τα ζώα μετά το στάδιο 66 κατά NF που δεν θα συνεχίσουν να εκτίθενται θα πρέπει να επιλέγονται τυχαία.

50. Τα ζώα που δεν επιλέγονται για συνέχιση της έκθεσης θανατώνονται με ευθανασία (βλ. παράγραφο 43). Για κάθε ζώο πραγματοποιούνται μετρήσεις του αναπτυξιακού σταδίου, του νωπού βάρους και του SVL (σχήμα 2β) και διενεργείται μακροσκοπική νεκροψία. Το φαινοτυπικό φύλο (βάσει της γοναδικής μορφολογίας) σημειώνεται ως θηλυκό, αρσενικό ή απροσδιόριστο.

Δειγματοληψία νεαρών ατόμων

Συνοπτική περιγραφή της δειγματοληψίας νεαρών ατόμων

51. Τα ζώα που απομένουν συνεχίζουν να εκτίθενται μέχρι να παρέλθουν 10 εβδομάδες μετά τον διάμεσο χρόνο μέχρι το στάδιο 62 κατά NF στον μάρτυρα νερού αραιώσης (και/ή στον μάρτυρα με διαλύτη, εάν ισχύει). Κατά τη λήξη της περιόδου έκθεσης, τα ζώα που απομένουν (10 βάτραχοι ανά πανομοιότυπο δείγμα κατά μέγιστο) θανατώνονται με ευθανασία και οι διάφορες παράμετροι μετρώνται ή αξιολογούνται και καταγράφονται: 1) μορφομετρικά στοιχεία (βάρος και μήκος), 2) αναλογίες φαινοτυπικών/γονοτυπικών φύλων, 3) βάρος ήπατος (ηπατοσωματικός δείκτης), 4) ιστοπαθολογία (γονάδες, αναπαραγωγικοί πόροι, ήπαρ και νεφρός) και, προαιρετικά, 5) VTG πλάσματος.

Θανάτωση βατράχων με ευθανασία

52. Τα δείγματα νεαρών ατόμων, οι βάτραχοι μετά τη μεταμόρφωση, θανατώνονται με ευθανασία με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση αναισθητικού, π.χ. MS-222 10 % σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Η εξέταση των βατράχων μπορεί να γίνει αφού αυτοί σταματήσουν να αντιδρούν (συνήθως γύρω στα 2 λεπτά μετά την έγχυση, εάν χρησιμοποιηθεί MS-222 10 % σε δοσολογία 0,01 ml ανά γραμμάριο βατράχου). Τα νεαρά άτομα βατράχων μπορούν επίσης να αναισθητοποιούνται με εμβύθιση σε αναισθητικό (MS-222) υψηλότερης συγκέντρωσης, αλλά η εμπειρία έχει δείξει ότι το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την αναισθητοποίησή τους είναι μεγαλύτερο όταν χρησιμοποιείται αυτή η μέθοδος και η αναισθησία μπορεί να μη διαρκεί όσο χρειάζεται για τη δειγματοληψία. Με την έγχυση εξασφαλίζεται αποτελεσματική και ταχεία ευθανασία πριν από τη δειγματοληψία. Η δειγματοληψία δεν θα πρέπει να ξεκινά μέχρι να επιβεβαιωθεί η έλλειψη αντίδρασης των βατράχων, ούτως ώστε να διασφαλίζεται ότι όλα τα ζώα είναι νεκρά. Εάν οι βάτραχοι εμφανίζουν συμπτώματα έντονης οδύνης (μπορεί να προβλεφθεί με ασφάλεια η πρόκληση ιδιαίτερα έντονης οδύνης και θανάτου) και θεωρούνται ετοιμοθάνατοι, πρέπει να αναισθητοποιούνται και να θανατώνονται με ευθανασία, και να συγκαταλέγονται στην παράμετρο της θνησιμότητας στο πλαίσιο της ανάλυσης δεδομένων. Όταν ένας βάτραχος θανατώνεται με ευθανασία λόγω νοσηρότητας, αυτό θα πρέπει να καταγράφεται και να περιλαμβάνεται στην έκθεση δοκιμής. Ανάλογα με τη χρονική στιγμή της μελέτης κατά την οποία θανατώνεται ο βάτραχος, μπορεί να διατηρείται με σκοπό τη διεξαγωγή ιστοπαθολογικής ανάλυσης (μονιμοποίηση του βατράχου για πιθανή ιστοπαθολογική ανάλυση).

Μορφομετρικά στοιχεία (βάρος και μήκος)

53. Οι μετρήσεις του νωπού βάρους και του SVL (σχήμα 2β) είναι όμοιες με εκείνες που περιγράφονται για τη δειγματοληψία υποδειγμάτων προνυμφών.

VTG πλάσματος (προαιρετικά)

54. Η VTG είναι ευρέως αποδεκτή ως βιοδείκτης που προκύπτει από την έκθεση σε οιστρογονικές χημικές ουσίες. Για τη LAGDA, μπορεί να μετράται προαιρετικά η VTG πλάσματος σε δείγματα νεαρών ατόμων (η μέτρηση μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη εάν που υπάρχουν υπόνοιες ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι οιστρογόνο).
55. Τα οπίσθια άκρα του θανατωμένου νεαρού ατόμου αποκόπτονται και συλλέγεται αίμα με ηπαρινισμένο τριχοειδές σωληνάριο (αν και μπορεί να είναι κατάλληλες εναλλακτικές μέθοδοι συλλογής αίματος, όπως η καρδιακή παρακέντηση). Το αίμα αποβάλλεται σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης (π.χ. όγκου 1,5 ml) και φυγοκεντρείται για να ληφθεί το πλάσμα. Τα δείγματα αίματος θα πρέπει να φυλάσσονται στους -70 °C ή σε χαμηλότερη θερμοκρασία μέχρι τον προσδιορισμό της VTG. Η συγκέντρωση της VTG στο πλάσμα μπορεί να μετρηθεί με ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδο προσδιορισμού (ELISA) (προσάρτημα 6), ή με εναλλακτική μέθοδο, όπως φασματομετρία μάζας (31). Προτιμώνται αντισώματα ειδικά για το συγκεκριμένο ζωικό είδος, λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας τους.

Προσδιορισμός γενετικού φύλου

56. Το γενετικό φύλο κάθε νεαρού ατόμου βατράχων αξιολογείται βάσει των δεικτών που ανέπτυξαν οι Yoshimoto *et al.* (11). Για τον προσδιορισμό του γενετικού φύλου, τμήμα (ή ολόκληρο) ενός οπίσθιου άκρου (ή οποιουδήποτε άλλου ιστού) που αφαιρέθηκε κατά την ανατομή συλλέγεται και φυλάσσεται σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης (δείγματα ιστών βατράχων μπορούν να ληφθούν από οποιονδήποτε ιστό). Ο ιστός μπορεί να φυλάσσεται στους -20°C ή σε χαμηλότερη θερμοκρασία μέχρι την απομόνωση του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA). Η απομόνωση του DNA από τους ιστούς μπορεί να πραγματοποιείται με κιτ του εμπορίου, ενώ η ανάλυση για την παρουσία ή την απουσία του δείκτη πραγματοποιείται με μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (προσάρτημα 5). Γενικά, η συμφωνία μεταξύ του ιστολογικού φύλου και του γονοτύπου στα ζώα μάρτυρες κατά τη χρονική στιγμή της δειγματοληψίας νεαρών ατόμων σε ομάδες μάρτυρες υπερβαίνει το 95 %.

Συλλογή ιστών και μονιμοποίηση για ιστοπαθολογική εξέταση

57. Κατά την τελευταία δειγματοληψία συλλέγονται οι γονάδες, οι γεννητικοί πόροι, οι νεφροί και τα ήπατα για ιστοπαθολογική ανάλυση. Η κοιλιακή κοιλότητα ανοίγεται και πραγματοποιείται εκτομή και ζύγιση του ήπατος. Στη συνέχεια, τα όργανα του πεπτικού συστήματος (π.χ. στομάχι, έντερα) αφαιρούνται προσεκτικά από την κάτω κοιλιακή χώρα

προκειμένου να αποκαλυφθούν οι γονάδες, οι νεφροί και οι γεννητικοί πόροι. Τυχόν μακροσκοπικές μορφολογικές ανωμαλίες στις γονάδες θα πρέπει να σημειώνονται. Τέλος, τα οπίσθια άκρα θα πρέπει να αφαιρούνται, εάν δεν έχουν ήδη αφαιρεθεί για συλλογή αίματος. Τα συλλεχθέντα ήπατα και το νεκρό σώμα με τις γονάδες αφημένες *in situ* θα πρέπει να τοποθετούνται αμέσως σε μέσο μονιμοποίησης Davidson. Ο όγκος του μέσου μονιμοποίησης στον περιέκτη θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερος του κατά προσέγγιση όγκου των ιστών. Όλοι οι ιστοί παραμένουν σε μέσο μονιμοποίησης Davidson επί τουλάχιστον 48 ώρες, αλλά όχι περισσότερο από 96 ώρες, οπότε και εκπλένονται με απιονισμένο νερό και φυλάσσονται σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης 10 % (1) (29).

Ιστοπαθολογία

58. Πραγματοποιείται αξιολόγηση της ιστοπαθολογικής εικόνας κάθε νεαρού ατόμου για την ανίχνευση τυχόν παθολογικών καταστάσεων στον ιστό των γονάδων, των γεννητικών πόρων, των νεφρών και του ήπατος, δηλ. διάγνωση και αξιολόγηση σοβαρότητας (32). Από την αξιολόγηση προσδιορίζεται επίσης ο φαινότυπος των γονάδων (π.χ. ωοθήκες, όρχεις, ακαθόριστο) και οι παρατηρήσεις αυτές, μαζί με τις επιμέρους μετρήσεις γενετικού φύλου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό των αναλογιών των φαινοτυπικών/γονοτυπικών φύλων.

ΑΝΑΦΟΡΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Στατιστική ανάλυση

59. Από τη LAGDA προκύπτουν τρεις τύποι δεδομένων προς στατιστική ανάλυση: 1) ποσοτικά συνεχή δεδομένα (βάρος, SVL, LSI, VTG), 2) δεδομένα χρόνου μέχρι τα συμβάντα για τα αναπτυξιακά ποσοστά (δηλ. ημέρες μέχρι το στάδιο 62 κατά NF από την έναρξη της δοκιμασίας) και 3) διατάξιμα δεδομένα υπό μορφή βαθμολογιών σοβαρότητας ή αναπτυξιακών σταδίων από ιστοπαθολογικές αξιολογήσεις.
60. Συνιστάται ο σχεδιασμός της δοκιμής και η επιλογή στατιστικής δοκιμής να παρέχουν επαρκή στατιστική ισχύ για την ανίχνευση των μεταβολών με βιολογική σημασία στις παραμέτρους σε σχέση με τις οποίες πρέπει να αναφέρεται NOEC ή EC_x. Για τις στατιστικές αναλύσεις των δεδομένων (γενικά, βάσει του μέσου όρου πανομοιότυπων δειγμάτων) θα πρέπει, κατά προτίμηση, να ακολουθούνται οι διαδικασίες που περιγράφονται στο έγγραφο «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application» (Σύγχρονες προσεγγίσεις στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων οικοτοξικότητας: Οδηγός εφαρμογής) (33). Στο προσάρτημα 7 της παρούσας μεθόδου δοκιμών περιλαμβάνεται το συνιστώμενο διάγραμμα αποφάσεων στατιστικής ανάλυσης και καθοδήγηση για την επεξεργασία των δεδομένων και την επιλογή του καταλληλότερου στατιστικού ελέγχου ή μοντέλου για χρήση στο πλαίσιο της LAGDA.

61. Τα δεδομένα από τη δειγματοληψία νεαρών ατόμων (π.χ. σωματική αύξηση, LSI) θα πρέπει να αναλύονται για κάθε γονοτυπικό φύλο χωριστά, δεδομένου ότι το γονοτυπικό φύλο προσδιορίζεται για όλα τα άτομα.

Θέματα ανάλυσης δεδομένων

Χρήση υπονομευμένων πανομοιότυπων δειγμάτων και αγωγών

62. Τα πανομοιότυπα δείγματα και οι αγωγές ενδέχεται να υπονομευτούν εξαιτίας υπέρμετρης θνησιμότητας λόγω έκδηλης τοξικότητας, ασθένειας ή τεχνικού σφάλματος. Σε περίπτωση υπονόμησης μιας αγωγής λόγω ασθένειας ή τεχνικού σφάλματος, θα πρέπει να υπάρχουν τρεις μη υπονομευμένες αγωγές με τρία μη υπονομευμένα πανομοιότυπα δείγματα διαθέσιμα για ανάλυση. Σε περίπτωση εμφάνισης έκδηλης τοξικότητας στις αγωγές υψηλής δόσης, καλό είναι να υπάρχουν τουλάχιστον τρία επίπεδα αγωγής με τρία μη υπονομευμένα πανομοιότυπα δείγματα διαθέσιμα για ανάλυση [όπως ορίζεται στην προσέγγιση μέγιστης ανεκτής συγκέντρωσης για τις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών του ΟΟΣΑ (34)]. Πέραν της τοξικότητας, στα σημεία έκδηλης τοξικότητας μπορεί να περιλαμβάνονται συμπεριφορικές επιδράσεις (π.χ. επίπλευση στην επιφάνεια, παραμονή στον πυθμένα της δεξαμενής, ανεστραμμένη ή ακανόνιστη κολύμβηση, έλλειψη δραστηριότητας ανάδυσης), μορφολογικές αλλοιώσεις (π.χ. αιμορραγικές αλλοιώσεις, κοιλιακό οίδημα) ή αναστολή των φυσιολογικών αντιδράσεων σίτισης σε ποιοτική σύγκριση με τα ζώα μάρτυρες.

Μάρτυρας με διαλύτη

63. Στο τέλος της δοκιμής θα πρέπει να αξιολογούνται οι πιθανές επιδράσεις του διαλύτη (εφόσον χρησιμοποιείται). Αυτό πραγματοποιείται μέσω στατιστικής σύγκρισης της ομάδας-μάρτυρα με διαλύτη και της ομάδας-μάρτυρα νερού αραίωσης. Οι πλέον κατάλληλες παράμετροι προς εξέταση στην ανάλυση αυτή είναι οι παράγοντες της σωματικής αύξησης (βάρος και μήκος), καθώς αυτές επηρεάζονται από τυχόν γενικευμένη τοξικότητα. Σε περίπτωση εντοπισμού στατιστικά σημαντικών διαφορών στις παραμέτρους αυτές μεταξύ των ομάδων μάρτυρα νερού αραίωσης και μάρτυρα με διαλύτη, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η βέλτιστη κρίση ειδικών προκειμένου να προσδιοριστεί το κατά πόσον υπονομεύεται η εγκυρότητα της δοκιμής. Εάν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων, οι αγωγές με την υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να συγκρίνονται με τον μάρτυρα με διαλύτη, εκτός εάν είναι γνωστό ότι προτιμάται η σύγκριση με τον μάρτυρα νερού αραίωσης. Εάν δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων μάρτυρα, συνιστάται οι αγωγές με την υπό δοκιμή χημική ουσία να συγκρίνονται με τις συγχωνευμένες ομάδες (ομάδες μάρτυρα με διαλύτη και μάρτυρα νερού αραίωσης), εκτός εάν είναι γνωστό ότι προτιμάται η σύγκριση είτε μόνο με την ομάδα μάρτυρα νερού αραίωσης είτε μόνο με την ομάδα μάρτυρα με διαλύτη.

Έκθεση δοκιμής

64. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

- φυσική μορφή και, εφόσον έχουν σημασία, φυσικοχημικές ιδιότητες,
- Μονοσυστατική ουσία:
 φυσική εμφάνιση, υδατοδιαλυτότητα και πρόσθετες σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,
 στοιχεία ταυτοποίησης της χημικής ουσίας, όπως ονομασία IUPAC ή CAS, αριθμός CAS, κωδικός SMILES ή InChI, συντακτικός τύπος, καθαρότητα, χημική ταυτότητα προσμίξεων, κατά περίπτωση και στο μέτρο του δυνατού, κ.λπ. (περιλαμβανομένης της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα, κατά περίπτωση).
- Πολυσυστατική ουσία, UVCB και μείγματα:
 περιγράφονται, στο μέτρο του δυνατού, με τη χημική ταυτότητα των συστατικών (βλ. ανωτέρω), την ποσότητα στην οποία απαντούν και τις σχετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Είδος δοκιμής:

- επιστημονική ονομασία, φυλή εάν είναι γνωστή, προέλευση και μέθοδος συλλογής των γονιμοποιημένων αυγών και μετέπειτα χειρισμός,
- συχνότητα εμφάνισης σκολίωσης σε ιστορικούς μάρτυρες για την αποθεματική καλλιέργεια που χρησιμοποιείται.

Συνθήκες δοκιμής:

- φωτοπερίοδος/-οι,
- σχεδιασμός δοκιμής (π.χ. μέγεθος θαλάμου, υλικό και όγκος νερού, αριθμός θαλάμων δοκιμής και πανομοιότυπων δειγμάτων, αριθμός οργανισμών δοκιμής ανά πανομοιότυπο δείγμα),
- μέθοδος παρασκευής των αποθεματικών διαλυμάτων και συχνότητα ανανέωσης (θα πρέπει να αναφέρεται το μέσο διαλυτοποίησης και η συγκέντρωσή του, εφόσον χρησιμοποιείται),
- μέθοδος χορήγησης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. αντλίες, συστήματα αραίωσης),
- η απόδοση ανάκτησης της μεθόδου και οι ονομαστικές συγκεντρώσεις της δοκιμής, το όριο ποσοτικού προσδιορισμού, ο μέσος όρος των μετρούμενων τιμών και οι τυπικές αποκλίσεις τους στα δοκιμαστικά δοχεία και η μέθοδος με την οποία επιτεύχθηκαν, καθώς

και στοιχεία που αποδεικνύουν ότι οι μετρήσεις αναφέρονται στις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε αληθές διάλυμα,

- χαρακτηριστικά του νερού αραίωσης: pH, σκληρότητα, θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, επίπεδα υπολειμματικού χλωρίου (εφόσον μετρούνται), ολικό ιώδιο, ολικός οργανικός άνθρακας (εφόσον μετριέται), αιωρούμενα στερεά (εφόσον μετρούνται), αλατότητα του δοκιμαστικού μέσου (εφόσον μετριέται) και τυχόν άλλες μετρήσεις,
- οι ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, οι μέσοι όροι των μετρούμενων τιμών και οι τυπικές αποκλίσεις τους,
- ποιότητα του νερού μέσα στα δοκιμαστικά δοχεία, pH, θερμοκρασία (καθημερινά) και συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου,
- λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη σίτιση (π.χ. είδος τροφής, πηγή, ποσότητα και συχνότητα χορήγησης).

Αποτελέσματα:

- ενδείξεις που αποδεικνύουν ότι οι μάρτυρες πληρούν τα κριτήρια εγκυρότητας,
- δεδομένα για τον μάρτυρα (συν τον μάρτυρα με διαλύτη, όταν χρησιμοποιείται) και τις ομάδες αγωγής, ως εξής: παρατηρούμενη θνησιμότητα και ανωμαλίες, χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF, ιστολογική αξιολόγηση του θυρεοειδούς (μόνο στο δείγμα προνυμφών), σωματική αύξηση (βάρους και μήκος), LSI (μόνο στο δείγμα νεαρών ατόμων), αναλογίες γενετικών/γονοτυπικών φύλων (μόνο στο δείγμα νεαρών ατόμων), αποτελέσματα ιστοπαθολογικής αξιολόγησης για τις γονάδες, τους γεννητικούς πόρους, τον νεφρό και το ήπαρ (μόνο στο δείγμα νεαρών ατόμων) και VTG πλάσματος (μόνο στο δείγμα νεαρών ατόμων, εάν διεξάγεται),
- προσέγγιση για τη στατιστική ανάλυση και την επεξεργασία των δεδομένων (στατιστικός έλεγχος ή στατιστικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε),
- συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) για κάθε απόκριση που αξιολογήθηκε,
- κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιπτώσεις (LOEC) για κάθε απόκριση που αξιολογήθηκε (σε $\alpha = 0,05$), EC_x για κάθε απόκριση που αξιολογήθηκε, κατά περίπτωση, και διαστήματα εμπιστοσύνης (π.χ. 95 %), καθώς και γραφική παράσταση του προσαρμοσμένου μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της, κλίση της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης, μαθηματικός τύπος του μοντέλου παλινδρόμησης, εκτιμώμενες παράμετροι του μοντέλου και τα τυπικά σφάλματά τους,
- οποιαδήποτε απόκλιση από τη μέθοδο δοκιμών και οι αποκλίσεις από τα κριτήρια αποδοχής, και εκτιμήσεις των δυνητικών επιπτώσεων στην έκβαση της δοκιμής.

65. Για τα αποτελέσματα των μετρήσεων παραμέτρων, θα πρέπει να παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις τους (ει δυνατόν, τόσο βάσει των πανομοιότυπων δειγμάτων όσο και βάσει των συγκεντρώσεων).
66. Θα πρέπει να υπολογίζεται ο διάμεσος χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF στους μάρτυρες και να παρουσιάζεται ως ο μέσος όρος των διάμεσων τιμών των πανομοιότυπων δειγμάτων με την τυπική απόκλισή τους. Παρομοίως, για τις αγωγές, θα πρέπει να υπολογίζεται μια διάμεση τιμή αγωγής και να παρουσιάζεται ως ο μέσος όρος των διάμεσων τιμών των πανομοιότυπων δειγμάτων με την τυπική απόκλισή τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (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 and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.
- (4) Kloas W and 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 and 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 and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.
- (9) Mikamo K and 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 and 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 and 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 and 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 and 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 and 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 and 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) Κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας.
- (18) Κεφάλαιο Γ.29 του παρόντος παραρτήματος: Άμεση βιοαποικοδομησιμότητα - CO₂ σε σφραγισμένα δοχεία (δοκιμή υπερκείμενης φάσης).
- (19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and 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 (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 and 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., 84 pp.
- (25) Κεφάλαιο Γ.38 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμασία μεταμόρφωσης αμφιβίων.
- (26) Κεφάλαιο Γ.48 του παρόντος παραρτήματος: Βραχυπρόθεσμη δοκιμή αναπαραγωγής σε ψάρια.
- (27) Κεφάλαιο Γ.41 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή σεξουαλικής ανάπτυξης ψαριών.
- (28) Κεφάλαιο Γ.49 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμή οξείας τοξικότητας σε έμβρυα ψαριών (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 and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.
- (31) Luna LG and 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.

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ

Παράμετρος κορυφαίου επιπέδου: που έχει επίδραση σε επίπεδο πληθυσμού.

Χημικό προϊόν: μια ουσία ή ένα μείγμα

Δοκιμή ELISA: ενζυμικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός

ECx: (αποτελεσματική συγκέντρωση για επίδραση x %): η συγκέντρωση που προκαλεί x % επίδρασης σε υπό δοκιμή οργανισμούς εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με μάρτυρα. Για παράδειγμα, η EC50 είναι η συγκέντρωση που εκτιμάται ότι προκαλεί επίδραση σε παράμετρο δοκιμής σε ποσοστό 50 % του εκτιθέμενου πληθυσμού επί καθορισμένη περίοδο έκθεσης.

dpf: (days post fertilization): ημέρες μετά τη γονιμοποίηση

Έλεγχος συνεχούς ροής: δοκιμή με συνεχή ροή των διαλυμάτων δοκιμής μέσω του συστήματος δοκιμής κατά τη διάρκεια της έκθεσης.

Άξονας HPG: άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων

IUPAC: Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας.

Η κατώτατη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιπτώσεις (LOEC) είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία παρατηρείται ότι η εν λόγω ουσία έχει στατιστικά σημαντική επίδραση (με $p < 0,05$), συγκριτικά με τον μάρτυρα. Ωστόσο, όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής που υπερβαίνουν τη LOEC αναμένεται να έχουν βλαβερή επίδραση ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται στη LOEC. Σε περίπτωση που δεν είναι δυνατόν να πληρούνται οι δύο αυτοί όροι, θα πρέπει να εξηγείται πλήρως ο τρόπος επιλογής της LOEC (και, κατ' επέκταση, της NOEC). Το προσάρτημα 7 παρέχει οδηγίες.

Μέση θανατηφόρος συγκέντρωση (LC50): η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που εκτιμάται ότι είναι θανατηφόρος για το 50 % των υπό δοκιμή οργανισμών κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) είναι η αμέσως χαμηλότερη της LOEC συγκέντρωση της δοκιμής, η οποία, συγκριτικά με τον μάρτυρα, δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης.

SMILES: (Simplified Molecular Input Line Entry Specification) προδιαγραφή απλοποιημένης μοριακής γραμμικής γραφής.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με χρήση της

παρούσας μεθόδου δοκιμών.

UVCB: ουσίες άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, πολύπλοκα προϊόντα αντιδράσεων ή βιολογικά υλικά.

VTG: η λεκιθογενίνη είναι φωσφολιπογλυκοπρωτεΐνη που αποτελεί πρόδρομη ένωση των πρωτεϊνών της λεκίθου του αυγού και συναντάται κανονικά σε σεξουαλικά ενεργά θηλυκά άτομα όλων των ωοτόκων ειδών.

Προσάρτημα 2**ΟΡΙΣΜΕΝΑ ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΟΣ ΑΠΟΔΕΚΤΟΥ ΝΕΡΟΥ ΑΡΑΙΩΣΗΣ**

Ουσία	Οριακή συγκέντρωση
Σωματίδια	5 mg/l
Ολικός οργανικός άνθρακας	2 mg/l
Μη ιοντισμένη αμμωνία	1 µg/l
Υπολείμματα χλωρίου	10 µg/l
Ολικά οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα	50 ng/l
Ολικά οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα συν πολυχλωριωμένα διφαινύλια	50 ng/l
Ολικό οργανικό χλώριο	25 ng/l
Αργίλιο	1 µg/l
Αρσενικό	1 µg/l
Χρώμιο	1 µg/l
Κοβάλτιο	1 µg/l
Χαλκός	1 µg/l
Σίδηρος	1 µg/l
Μόλυβδος	1 µg/l
Νικέλιο	1 µg/l
Ψευδάργυρος	1 µg/l
Κάδμιο	100 ng/l
Υδράργυρος	100 ng/l
Άργυρος	100 ng/l

Προσάρτημα 3**ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΟΚΙΜΗΣ ΓΙΑ ΤΗ LAGDA**

1. Είδος δοκιμής	<i>Xenopus laevis</i>
2. Τύπος δοκιμής	Συνεχούς ροής
3. Θερμοκρασία νερού	Η ονομαστική θερμοκρασία είναι 21 °C. Η μέση θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της δοκιμής είναι 21 ± 1 °C (οι διαφορές μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων και μεταξύ των αγωγών δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τον 1,0 °C)
4. Ποιότητα φωτισμού	Λαμπτήρες φθορισμού (ευρέος φάσματος) 600-2000 lux (lumen/m ²) στην επιφάνεια του νερού
5. Φωτοπερίοδος	12 ώρες φως/12 ώρες σκοτάδι
6. Όγκος υπό δοκιμή χημικής ουσίας και δοκιμαστικό δοχείο (δεξαμενή)	4-10 l (βάθος νερού τουλάχιστον 10–15 cm) Δεξαμενή από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα
7. Ανανεώσεις του όγκου των διαλυμάτων δοκιμής	Σταθερές, βάσει της διατήρησης των βιολογικών συνθηκών και της έκθεσης στη χημική ουσία (π.χ. 5 ανανεώσεις του όγκου δεξαμενής ημερησίως)
8. Ηλικία των οργανισμών δοκιμής κατά την έναρξη	στάδιο 8-10 κατά Nieuwkoop και Faber (NF)
9. Αριθμός οργανισμών ανά πανομοιότυπο δείγμα	20 ζώα (έμβρυα)/δεξαμενή (πανομοιότυπο δείγμα) κατά την έναρξη της έκθεσης και 10 ζώα (νεαρά άτομα)/δεξαμενή (πανομοιότυπο δείγμα) μετά το στάδιο 66 κατά NF μέχρι τη λήξη της έκθεσης
10. Αριθμός αγωγών	Τουλάχιστον 4 αγωγές με την υπό δοκιμή χημική ουσία, συν κατάλληλοι μάρτυρες
11. Αριθμός πανομοιότυπων δειγμάτων ανά αγωγή	4 πανομοιότυπα δείγματα ανά αγωγή για την υπό δοκιμή χημική ουσία και 8 πανομοιότυπα δείγματα για τον ή τους μάρτυρες
12. Αριθμός οργανισμών ανά συγκέντρωση δοκιμής	Τουλάχιστον 80 ζώα ανά αγωγή για την υπό δοκιμή χημική ουσία και 160 πανομοιότυπα δείγματα για τον ή τους μάρτυρες
13. Νερό αραιώσης	Οποιοδήποτε νερό επιτρέπει τη φυσιολογική αύξηση και ανάπτυξη του <i>X. laevis</i> (π.χ. νερό πηγής ή νερό βρύσης διηθούμενο από φίλτρο ενεργού άνθρακα)
14. Αερισμός	Δεν απαιτείται, αλλά ο αερισμός των δεξαμενών μπορεί να είναι απαραίτητος σε περίπτωση που τα επίπεδα του διαλυμένου οξυγόνου μειωθούν κάτω από τα συνιστώμενα όρια και μεγιστοποιηθούν οι

	αυξήσεις της ροής του διαλύματος δοκιμής.
15. Διαλυμένο οξυγόνο του διαλύματος δοκιμής	Διαλυμένο οξυγόνο: ≥ 40 % της τιμής κορεσμού αέρα ή $\geq 3,5$ mg/l
16. pH του διαλύματος δοκιμής	6,5-8,5 (οι διαφορές μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων και μεταξύ των αγωγών δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν το 0,5)
17. Σκληρότητα και αλκαλικότητα του διαλύματος δοκιμής	10-250 mg CaCO ₃ /l
18. Πρόγραμμα σίτισης	(βλέπε προσάρτημα 4)
19. Περίοδος έκθεσης	Από το στάδιο 8-10 κατά NF έως δέκα εβδομάδες μετά τον διάμεσο χρόνο μέχρι το στάδιο 62 κατά NF σε νερό και/ή ομάδα μάρτυρα με διαλύτη (17 εβδομάδες κατά μέγιστο)
20. Βιολογικές παράμετροι	Θνησιμότητα (και ανωμαλίες στην εμφάνιση), χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF (δείγμα προνυμφών), ιστολογική αξιολόγηση του θυρεοειδούς (μόνο στο δείγμα προνυμφών), σωματική αύξηση (βάρος και μήκος), ηπατοσωματικός δείκτης (δείγμα νεαρών ατόμων), αναλογίες γενετικών/γονοτυπικών φύλων (δείγμα νεαρών ατόμων), ιστοπαθολογική αξιολόγηση γονάδων, γεννητικών πόρων, νεφρών και ήπατος (δείγμα νεαρών ατόμων) και VTG πλάσματος (δείγμα νεαρών ατόμων, προαιρετικά)
21. Κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής	Το διαλυμένο οξυγόνο θα πρέπει να είναι > 40 % της τιμής κορεσμού αέρα· η μέση θερμοκρασία του νερού θα πρέπει να είναι 21 ± 1 °C και οι διαφορές μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων / μεταξύ των αγωγών πρέπει να είναι $1,0$ °C· το pH του διαλύματος δοκιμής θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6,5 και 8,5· η θνησιμότητα στον μάρτυρα θα πρέπει να είναι ≤ 20 % σε κάθε πανομοιότυπο δείγμα, και ο μέσος χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF στον μάρτυρα θα πρέπει να είναι ≤ 45 ημέρες· το μέσο βάρος των οργανισμών δοκιμής στο στάδιο 62 κατά NF και στη λήξη της δοκιμασίας στους μάρτυρες και στους μάρτυρες με διαλύτη (εφόσον χρησιμοποιούνται) θα πρέπει να φτάνει τα $1,0 \pm 0,2$ και $11,5 \pm 3$ g, αντίστοιχα· θα πρέπει να υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα διατηρήθηκαν ικανοποιητικά στα όρια του ± 20 % του μέσου όρου των τιμών που μετρήθηκαν.

Προσάρτημα 4

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΙΤΙΣΗΣ

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι παρότι το παρόν πρόγραμμα σίτισης είναι το συνιστώμενο, επιτρέπεται η εφαρμογή εναλλακτικών προγραμμάτων υπό την προϋπόθεση ότι οι οργανισμοί δοκιμής αυξάνονται και αναπτύσσονται με τον κατάλληλο ρυθμό.

Σίτιση των προνυμφών

Παρασκεύασμα για σιτηρέσιο προνυμφών

- A. 1:1 (κ.ό.) αρχική τροφή για πέστροφες: φύκη/TetraFin® (ή ισοδύναμο),
1. Αρχική τροφή για πέστροφες: αναμίξετε 50 g αρχικής τροφής για πέστροφες (λεπτοί κόκκοι ή σκόνη) και 300 ml κατάλληλα διηθημένου νερού σε αναμικτήρα σε υψηλή ταχύτητα επί 20 δευτερόλεπτα
 2. Μείγμα φυκών/TetraFin® (ή ισοδύναμο): αναμίξετε 12 g δισκίων φυκών σπιρουλίνας και 500 ml διηθημένου νερού σε αναμικτήρα σε υψηλή ταχύτητα επί 40 δευτερόλεπτα, αναμίξετε 12 g Tetrafin® (ή ισοδύναμο) με 500 ml διηθημένου νερού και, στη συνέχεια, συνδυάστε τα για να παρασκευάσετε 1 L φυκών σπιρουλίνας 12 g/l και Tetrafin®(ή ισοδύναμο) 12 g/l
 3. Συνδυάστε ίσους όγκους της αναμειγμένης αρχικής τροφής πέστροφας και του μείγματος φυκών/TetraFin® (ή ισοδύναμο)
- B. Γαρίδες της άλμης:

15 ml αυγών γαρίδας της άλμης εκκολάπτονται σε 1 l αλατισμένου νερού (παρασκευάζεται με προσθήκη 20 ml NaCl σε 1 l απιονισμένου νερού). Μετά από αερισμό επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό σταθερό φωτισμό, οι γαρίδες συλλέγονται. Οι γαρίδες αφήνονται να κατακαθίσουν επί 30 λεπτά με διακοπή του αερισμού. Οι κύστες που επιπλέουν στην επιφάνεια του δοχείου αποχύνονται και απορρίπτονται, και οι γαρίδες διηθούνται από κατάλληλα φίλτρα και φέρονται στα 30 ml με διηθημένο νερό.

Πρωτόκολλο σίτισης

Στον πίνακα 1 παρέχονται στοιχεία αναφοράς όσον αφορά τον τύπο και την ποσότητα της τροφής που χρησιμοποιείται στα στάδια έκθεσης των προνυμφών. Τα ζώα θα πρέπει να σιτίζονται τρεις φορές ημερησίως από Δευτέρα έως Παρασκευή και μία φορά ημερησίως τα Σαββατοκύριακα.

Πίνακας 1: Πρόγραμμα σίτισης για τις προνύμφες *X. laevis* σε συνθήκες συνεχούς ροής

Χρόνος* (μετά τη	Αρχική τροφή για πέστροφες: φύκη/TetraFin®(ή ισοδύναμο)	Γαρίδες της άλμης
---------------------	--	-------------------

γονιμοποίηση)	Καθημερινές (3 φορές ημερησίως)	Σαββατοκύριακο (μία φορά ημερησίως)	Καθημερινές (δύο φορές ημερησίως)	Σαββατοκύριακο (μία φορά ημερησίως)
Ημέρες 4-14 (τις εβδομάδες 0-1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (από την ημέρα 8 έως την ημέρα 15)	0,5 ml (από την ημέρα 8 έως την ημέρα 15)
Εβδομάδα 2	0,67 ml	2,4 ml	1 ml (από την ημέρα 16)	1 ml (από την ημέρα 16)
Εβδομάδα 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Εβδομάδα 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Εβδομάδα 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
Εβδομάδα 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Εβδομάδα 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Εβδομάδες 8-10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

* Η ημέρα 0 ορίζεται ως η ημέρα που πραγματοποιείται η έγχυση hCG.

Μετάβαση από το σιτηρέσιο προνυμφών στο σιτηρέσιο νεαρών ατόμων

Καθώς οι προνύμφες ολοκληρώνουν τη μεταμόρφωση, μεταβαίνουν σε παρασκεύασμα σιτηρεσίου νεαρών ατόμων, το οποίο εξηγείται παρακάτω. Στη διάρκεια της μετάβασης αυτής, το σιτηρέσιο προνυμφών θα πρέπει να μειώνεται καθώς αυξάνεται η τροφή για νεαρά άτομα. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω αναλογικής μείωσης της τροφής προνυμφών με ταυτόχρονη αναλογική αύξηση της τροφής για τα νεαρά άτομα καθώς κάθε ομάδα πέντε γυρίνων περνά το στάδιο 62 κατά NF και πλησιάζει την ολοκλήρωση της μεταμόρφωσης στο στάδιο 66 κατά NF.

Σίτιση των νεαρών ατόμων

Σιτηρέσιο νεαρών ατόμων

Αφού ολοκληρωθεί η μεταμόρφωση (στάδιο 66), το πρόγραμμα σίτισης αλλάζει και πλέον χορηγείται αποκλειστικά υψηλής ποιότητας βυθιζόμενη τροφή βατράχων 3/32 ιντσών (Xenopus Express™, FL, ΗΠΑ) ή αντίστοιχη.

Παρασκεύασμα συνθλιμμένων κόκκων για τη μετάβαση από τις προνύμφες στα νεαρά άτομα

Οι κόκκοι βυθιζόμενης τροφής βατράχων αλέθονται για σύντομο χρονικό διάστημα σε συσκευή άλεσης καφέ, αναμικτήρα ή γουδί προκειμένου να μειωθεί το μέγεθος των κόκκων κατά περίπου 1/3. Η επεξεργασία για υπερβολικά μεγάλο χρονικό διάστημα έχει ως αποτέλεσμα την κονιοποίηση του παρασκευάσματος και δεν συνιστάται.

Πρωτόκολλο σίτισης

Στον **πίνακα 2** παρέχονται στοιχεία αναφοράς όσον αφορά τον τύπο και την ποσότητα της τροφής που χρησιμοποιείται στα στάδια των νεαρών ατόμων και της ενήλικης ζωής. Τα ζώα θα πρέπει να σιτίζονται μία φορά ημερησίως. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι καθώς τα ζώα μεταμορφώνονται, εξακολουθούν να λαμβάνουν μέρος του σιτηρεσίου γαρίδων της άλμης μέχρις ότου το 95 % εξ αυτών ολοκληρώσει τη μεταμόρφωση.

Τα ζώα δεν θα πρέπει να σιτίζονται την ημέρα της λήξης της δοκιμής, προκειμένου να αποφευχθεί η πρόκληση σύγχυσης στις μετρήσεις του βάρους λόγω της τροφής.

Πίνακας 2: Πρόγραμμα σίτισης για τα νεαρά άτομα *X. laevis* σε συνθήκες συνεχούς ροής. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι τα ζώα που δεν έχουν μεταμορφωθεί, περιλαμβανομένων των ζώων των οποίων η μεταμόρφωση έχει καθυστερήσει λόγω της αγωγής με την υπό δοκιμή ουσία, δεν μπορούν να καταναλώσουν μη αλεσμένους κόκκους.

Χρόνος (Εβδομάδες μετά τη διάμεση ημερομηνία μεταμόρφωσης)	Όγκος αλεσμένων κόκκων (mg ανά νεαρό άτομο)	Όγκος ολόκληρων κόκκων (mg ανά νεαρό άτομο)
Καθώς τα ζώα ολοκληρώνουν τη μεταμόρφωση	25	0
Εβδομάδες 0-1	25	28
Εβδομάδες 2-3	0	110
Εβδομάδες 4-5	0	165
Εβδομάδες 6-9	0	220

* Η πρώτη ημέρα της εβδομάδας 0 είναι η διάμεση ημερομηνία μεταμόρφωσης στα ζώα μάρτυρες.

Προσάρτημα 5

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΦΥΛΟΥ

Η μέθοδος προσδιορισμού του γενετικού φύλου για το *Xenopus laevis* βασίζεται στην εργασία των Yoshimoto *et al.*, 2008. Οι αναλυτικές διαδικασίες για τη γονοτύπηση παρατίθενται στην εργασία αυτή, αν χρειαστεί. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές μέθοδοι (π.χ. qPCR υψηλής απόδοσης), εφόσον θεωρούνται κατάλληλες.

Εκκνητές *X. laevis*

Δείκτης *DM-W*

Πρόσθιος: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Αντίστροφος: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Θετικός μάρτυρας

Πρόσθιος: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Αντίστροφος: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Καθαρισμός DNA

Καθαρίστε το DNA από ιστούς μυών ή δέρματος χρησιμοποιώντας π.χ. το DNeasy Blood and Tissue Kit της Qiagen (αριθ. κατ. 69506) ή παρόμοιο προϊόν, σύμφωνα με τις οδηγίες του κιτ. Το DNA μπορεί να εκλούεται από τις στήλες με μικρότερη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ώστε να προκύπτουν δείγματα υψηλότερης συγκέντρωσης, εφόσον θεωρείται απαραίτητο για την PCR. Επισημαίνεται ότι το DNA είναι αρκετά σταθερό και, ως εκ τούτου, χρειάζεται προσοχή ώστε να αποφεύγεται η διασταυρούμενη μόλυνση που θα μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα εσφαλμένο χαρακτηρισμό αρσενικών ως θηλυκών ή το αντίστροφο.

PCR

Ένα παράδειγμα πρωτοκόλλου με χρήση της JumpStart™ *Taq* της Sigma περιγράφεται συνοπτικά στον **πίνακα 1**.

Πίνακας 1: Παράδειγμα πρωτοκόλλου με χρήση της JumpStart™ *Taq* της Sigma.

Κύριο μείγμα	1x (μl)	[Τελικό]
--------------	---------	----------

NFW	11	-
Ρυθμιστικό διάλυμα 10X	2,0	-
MgCl ₂ (25mM)	2,0	2,5 mM
dNTP (10mM το καθένα)	0,4	200 μM
Πρόσθιος εκκινητής δείκτη (8 μM)	0,8	0,3 μM
Αντίστροφος εκκινητής δείκτη (8 μM)	0,8	0,3 μM
Πρόσθιος εκκινητής μάρτυρα (8 μM)	0,8	0,3 μM
Αντίστροφος εκκινητής μάρτυρα (8 μM)	0,8	0,3 μM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 μονάδες/μl
Μήτρα DNA	1,0	~200 pg/μl

Σημείωση: Κατά την παρασκευή των κύριων μειγμάτων, παρασκευάζετε επιπλέον ποσότητες για την περίπτωση τυχόν απώλειας κατά το πιπετάρισμα (παράδειγμα: το 25x θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο για 24 αντιδράσεις).

Αντίδραση:

Κύριο μείγμα 19,0 μl

Μήτρα 1,0 μl

Σύνολο 20,0 μl

Χαρακτηριστικά θερμικού κυκλοποιητή (Thermocycler):

Στάδιο 1. 94 °C 1 min

Στάδιο 2. 94 °C 30 δευτερόλεπτα

Στάδιο 3. 60 °C 30 δευτερόλεπτα

Στάδιο 4. 72 °C 1 min

Στάδιο 5. Μετάβαση στο στάδιο 2. 35 κύκλοι

Στάδιο 6. 72 °C 1 min

Στάδιο 7. 4 °C αναμονή

Τα προϊόντα PCR μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα σε γέλη ή να φυλαχθούν στους 4 °C.

Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης (3 %) (δείγμα πρωτοκόλλου)

50X TAE

Tris 24,2 g
 Παγόμορφο οξικό οξύ 5,71 ml
 Na₂ (EDTA)·2H₂O 3,72 g
 Προσθέστε νερό μέχρι τα 100 ml

1X TAE

H₂O 392 ml
 50X TAE 8 ml

Αγαρόζη 3:1

3 μέρη αγαρόζης NuSieve™ GTG™
 1 μέρος αγαρόζης Fisher χαμηλής ηλεκτροενδόσμωσης (EEO)

Μέθοδος

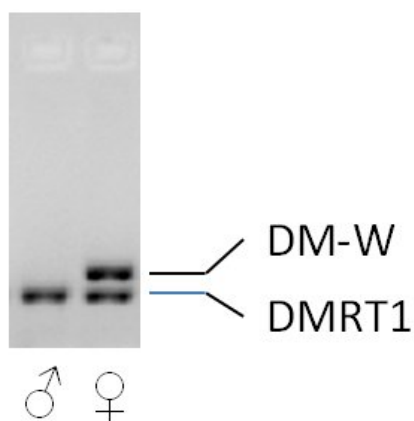
1. Παρασκευάστε γέλη 3 % προσθέτοντας 1,2 g μείγματος αγαρόζης σε 43 ml TAE 1X. Περιδινήστε για να αποκολληθούν τα μεγάλα συσσωματώματα.
2. Θερμάνετε το μείγμα αγαρόζης σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί τελείως (αποφύγετε την υπερχέλιση). Αφήστε να κρυώσει ελαφρώς.
3. Προσθέστε 1,0 μL βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml). Περιδινήστε τη φιάλη. Επισημαίνεται ότι το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μεταλλαξιγόνο και, ως εκ τούτου, στο στάδιο αυτό θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εναλλακτικές χημικές ουσίες εφόσον αυτό είναι τεχνικά εφικτό, ούτως ώστε να ελαχιστοποιούνται οι κίνδυνοι για την υγεία των εργαζομένων¹.
4. Χύστε τη γέλη σε καλούπι με κτένι. Αφήστε να κρυώσει εντελώς.
5. Προσθέστε τη γέλη στη συσκευή. Καλύψτε τη γέλη με TAE 1X.
6. Προσθέστε 1 μl χρωστικής φόρτωσης 6x σε κάθε προϊόν PCR 10 μl.

¹ Σύμφωνα με το άρθρο 4 παράγραφος 1 της οδηγίας 2004/37/EK του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 29ης Απριλίου 2004, σχετικά με την προστασία των εργαζομένων από τους κινδύνους που συνδέονται με την έκθεση σε καρκινογόνους ή μεταλλαξιογόνους παράγοντες κατά την εργασία (έκτη ειδική οδηγία κατά την έννοια του άρθρου 16 παράγραφος 1 της οδηγίας 89/391/ΕΟΚ του Συμβουλίου) (ΕΕ L 158 της 30.4.2004, σ. 50).

7. Μεταγγίστε τα δείγματα στις κοιλότητες με πιπέτα.
8. Ηλεκτροφορήστε στα 160 V σταθερής τάσης επί ~20 λεπτά.

Στο **σχήμα 1** φαίνεται εικόνα γέλης αгарόζης με ενδεικτικές ζώνες για τα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα.

Σχήμα 1: Εικόνα γέλης αгарόζης με τις ζώνες που υποδεικνύουν αρσενικό άτομο (♂) (μία ζώνη ~203 bp: DMRT1) και θηλυκό άτομο (♀) (δύο ζώνες στα ~259 bp: DM-W και στα 203 bp: DMRT1).



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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.

Προσάρτημα 6

ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΛΕΚΙΘΟΓΕΝΙΝΗΣ

Η μέτρηση της λεκιθογενίνης (VTG) πραγματοποιείται με χρήση μεθόδου ενζυμικού ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (ELISA) που αναπτύχθηκε αρχικά για τη VTG του χοντροκέφαλου φοξίνου (Parks *et al.*, 1999). Δεν υπάρχουν στο εμπόριο αντισώματα για το *X. laevis* προς το παρόν. Ωστόσο, δεδομένης της πληθώρας των πληροφοριών για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη και της διαθεσιμότητας οικονομικά αποδοτικών εμπορικών υπηρεσιών παραγωγής αντισωμάτων, θεωρείται εύλογα ότι τα εργαστήρια θα μπορούν εύκολα να αναπτύξουν μια μέθοδο ELISA για τη μέτρηση αυτή (Olmstead *et al.*, 2009). Επίσης, οι Olmstead *et al.* (2009) παρέχουν μια περιγραφή της δοκιμασίας, όπως τροποποιήθηκε για τη VTG στον *X. tropicalis*, όπως φαίνεται παρακάτω. Η μέθοδος χρησιμοποιεί ένα αντίσωμα που παρήχθη ενάντια στη VTG του *X. tropicalis*, αλλά το οποίο είναι γνωστό ότι δεσμεύει και τη VTG του *X. laevis*. Σημειώνεται ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν και μη ανταγωνιστικές μέθοδοι ELISA, και ότι αυτές ίσως έχουν χαμηλότερα όρια ανίχνευσης απ' ό,τι η μέθοδος που περιγράφεται παρακάτω.

Υλικά και αντιδραστήρια

- Ορός προ-προσροφημένου 1ου αντισώματος (Ab)

Αναμίξτε 1 μέρος ορού 1ου Ab αντι-VTG *X. tropicalis* με 2 μέρη πλάσματος αρσενικού μάρτυρα και αφήστε σε θερμοκρασία δωματίου επί ~ 75 λεπτά, τοποθετήστε σε πάγο επί 30 λεπτά, φυγοκεντρήστε > 20K x g επί 1 ώρα στους 4 °C, αφαιρέστε το υπερκείμενο υγρό, χωρίστε σε μερίδες και φυλάξτε στους -20 °C.

- 2ο αντίσωμα

συζευγμένο αντίσωμα αιγός έναντι πρωτεϊνών κουνελιού IgG-HRP (π.χ., Bio-Rad 172-1019)

- Πρότυπο VTG

κεκαθαρμένη VTG *X. laevis* στα 3,3 mg/ml.

- TMB (3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη) (π.χ. KPL 50-76-00 ή Sigma T0440)
- Κανονικός ορός αιγός (NGS) (π.χ. Chemicon® S26-100ml)
- Τρυβλία μικροτιτλοδότησης EIA 96 κοιλοτήτων από πολυστυρόλιο (π.χ. ICN: 76-381-04, Costar:53590, Fisher:07-200-35)
- Κλίβανος υβριδοποίησης 37 °C (ή επωαστήρας αέρα ταχείας εξισορρόπησης) για τρυβλία, υδατόλουτρο για σωληνάρια
- Άλλος συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, χημικές ουσίες και υλικά.

Συνταγές

Ρυθμιστικό διάλυμα επικάλυψης (50 mM ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικών, pH 9,6):

NaHCO ₃	1,26 g
Na ₂ CO ₃	0,68 g
νερό	428 ml

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

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,83 g
Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O	20,1 g
NaCl	71 g
νερό	810 ml

Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (PBST):

10X PBS	100 ml
νερό	900 ml

Ρυθμίστε το pH σε 7,3 με HCl 1 M και κατόπιν προσθέστε 0,5 ml Tween-20

Ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας:

Κανονικός ορός αιγός (NGS)	3,75 ml
Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης	146,25 ml

Συλλογή δειγμάτων

Το αίμα συλλέγεται με ηπαρινισμένο σωληνάριο μικροαιματοκρίτη και τοποθετείται σε πάγο. Μετά από φυγοκέντρηση επί 3 λεπτά, το σωληνάριο βαθμολογείται, ανοίγεται και το πλάσμα μεταφέρεται σε σωληνάρια μικροφυγοκέντρησης 0,6 ml που περιέχουν 0,13 μονάδες λυοφιλιωμένης απροτινίνης. (Τα σωληνάρια αυτά προετοιμάζονται εκ των προτέρων, με προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας απροτινίνης, κατάψυξη και λυοφιλίωση σε speed-vac σε χαμηλή θερμοότητα μέχρι να ξηρανθούν). Φυλάσσετε το πλάσμα στους -80 °C, μέχρι την ανάλυση.

Διαδικασία για ένα τρυβλίο

Επικάλυψη του τρυβλίου

Αναμίξτε 20 μl κεκαθαρμένης VTG με 22 ml ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικών (τελικό

3 µg/ml). Προσθέστε 200 µl σε κάθε κοιλότητα τρυβλίου 96 κοιλοτήτων. Καλύψτε το τρυβλίο με αυτοκόλλητη μεμβράνη στεγανοποίησης και αφήστε να επωαστεί στους 37 °C επί 2 ώρες (ή στους 4 °C όλη τη νύχτα).

Παραμπόδιση του τρυβλίου

Παρασκευάζεται παρεμποδιστικό διάλυμα με προσθήκη 2 ml κανονικού ορού αίγας (NGS) σε 38 ml ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικών. Αφαιρέστε το διάλυμα επικάλυψης και τινάξτε το τρυβλίο για να στεγνώσει. Προσθέστε 350 µl του παρεμποδιστικού διαλύματος σε κάθε κοιλότητα. Καλύψτε με αυτοκόλλητη μεμβράνη στεγανοποίησης και αφήστε να επωαστεί στους 37 °C επί 2 ώρες (ή στους 4 °C όλη τη νύχτα).

Παρασκευή των προτύπων

5,8 µl κεκαθαρμένου προτύπου VTG αναμιγνύεται με 1,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας σε αναλώσιμο σωληνάριο δοκιμής 12 x 75 mm από βοριοπυριτικό γυαλί. Κατ' αυτόν τον τρόπο προκύπτουν 12 760 ng/ml. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται διαδοχική αραιώση με προσθήκη 750 µl της προηγούμενης αραιώσης σε 750 µl ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας ώστε να προκύψουν τελικές συγκεντρώσεις 12 760, 6380, 3190, 1595, 798, 399, 199, 100, και 50 ng/ml.

Παρασκευή των δειγμάτων

Ξεκινήστε με αραιώση πλάσματος 1:300 (συνδυάζοντας π.χ. 1 µl πλάσματος με 299 µl ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας) ή 1:30 σε ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας. Εάν αναμένεται μεγάλη ποσότητα VTG, μπορεί να χρειαστούν πρόσθετες ή μεγαλύτερες αραιώσεις. Προσπαθήστε να διατηρήσετε το B/B₀ εντός της περιοχής των προτύπων. Για δείγματα χωρίς υπολογίσιμη VTG, π.χ. αρσενικά και θηλυκά μάρτυρες (τα οποία είναι όλα ανώριμα), χρησιμοποιήστε την αραιώση 1:30. Δείγματα που αραιώνονται σε αναλογίες μικρότερες από αυτή μπορεί να εμφανίσουν ανεπιθύμητα φαινόμενα μήτρας.

Επιπλέον, συνιστάται να χρησιμοποιείτε ένα δείγμα θετικού μάρτυρα σε κάθε τρυβλίο. Το δείγμα αυτό προέρχεται από δεξαμενή πλάσματος που περιέχει υψηλά επίπεδα VTG από επαγωγή. Η δεξαμενή αραιώνεται αρχικά σε NGS, διαιρείται σε μερίδες και φυλάσσεται στους -80 °C. Για κάθε τρυβλίο, μία μερίδα αποψύχεται, αραιώνεται περαιτέρω σε ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας και χρησιμοποιείται κατά τον ίδιο τρόπο με το δείγμα δοκιμής.

Επώαση με το 1ο αντίσωμα

Το 1ο Ab παρασκευάζεται μέσω αραιώσης ορού προ-προσροφημένου 1ου Ab 1:2000 σε ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμασίας (π.χ. 8 µl σε 16 ml ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας). Συνδυάστε 300 µl διαλύματος 1ου Ab με 300 µl δείγματος/προτύπου σε γυάλινο σωληνάριο. Το σωληνάριο B₀ ετοιμάζεται με παρόμοιο τρόπο με 300 µl ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας και 300 µl αντισώματος. Επίσης, θα πρέπει να ετοιμαστεί σωληνάριο NSB με χρήση 600 µl μόνο ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας, δηλ. χωρίς Ab.

Καλύψτε τα σωληνάρια με Parafilm και περιδινήστε ήπια για να αναμιχθούν. Επωάστε σε υδατόλουτρο στους 37 °C επί 1 ώρα.

Έκπλυση του τρυβλίου

Ακριβώς πριν ολοκληρωθεί η επώαση του 1ου Ab, εκπλύνετε το τρυβλίο. Αυτό γίνεται τινάζοντας το τρυβλίο για να φύγει το περιεχόμενο και ταμπονάροντας ελαφρά με απορροφητικό χαρτί για να στεγνώσει. Στη συνέχεια, γεμίστε τις κοιλότητες με 350 μl διαλύματος έκπλυσης, αδειάστε και ταμπονάρετε ελαφρά. Σε αυτό το στάδιο είναι χρήσιμη μια πολυκάναλη πιπέτα ή συσκευή έκπλυσης τρυβλίων. Το στάδιο της έκπλυσης επαναλαμβάνεται δύο φορές ώστε να γίνουν συνολικά τρεις εκπλύσεις.

Φόρτωση του τρυβλίου

Μετά την έκπλυση του τρυβλίου, αφαιρέστε τα σωληνάρια από το υδατόλουτρο και περιδινήστε ελαφρά. Προσθέστε 200 μl από κάθε σωληνάριο δείγματος, προτύπου, B₀ και NSB σε διπλές κοιλότητες του τρυβλίου. Καλύψτε το τρυβλίο με αυτοκόλλητη μεμβράνη στεγανοποίησης και αφήστε να επωαστεί επί 1 ώρα στους 37 °C.

Επώαση με το 2ο αντίσωμα

Μετά το τέλος της επώασης του προηγούμενου σταδίου, το τρυβλίο θα πρέπει να εκπλυθεί εκ νέου τρεις φορές, όπως περιγράφεται παραπάνω. Το αραιωμένο 2ο Ab παρασκευάζεται με ανάμιξη 2,5 μl του 2ου Ab με 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας. Προσθέστε 200 μl αραιωμένου 2ου Ab σε κάθε κοιλότητα, καλύψτε με αυτοκόλλητο όπως παραπάνω, και επωάστε επί 1 ώρα στους 37 °C.

Προσθήκη υποστρώματος

Αφού ολοκληρωθεί η επώαση με το 2ο Ab, εκπλύνετε το τρυβλίο τρεις φορές όπως περιγράφεται παραπάνω. Στη συνέχεια, προσθέστε 100 μl υποστρώματος TMB σε κάθε κοιλότητα. Αφήστε την αντίδραση να εξελιχθεί επί 10 λεπτά, κατά προτίμηση μακριά από έντονο φως. Διακόψτε την αντίδραση προσθέτοντας 100 μl φωσφορικού οξέος 1 M. Το χρώμα θα αλλάξει από μπλε σε έντονο κίτρινο. Μετρήστε την απορρόφηση στα 450 nm χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης τρυβλίων.

Υπολογισμός του B/B₀

Αφαιρέστε τη μέση τιμή NSB από όλες τις μετρήσεις. Το B/B₀ για κάθε δείγμα και πρότυπο υπολογίζεται με διαίρεση της τιμής απορρόφησης (B) διά της μέσης απορρόφησης του δείγματος B₀.

Χάραξη πρότυπης καμπύλης και προσδιορισμός άγνωστων ποσοτήτων

Χαράξτε μια πρότυπη καμπύλη με τη βοήθεια λογισμικού σχεδίασης γραφικών παραστάσεων (π.χ. Slidewrite™ ή Sigma Plot®) η οποία θα υπολογίζει μέσω παρεκβολής την ποσότητα από το B/B₀ δείγματος με βάση το B/B₀ των προτύπων. Συνήθως η ποσότητα

χαράσσεται σε λογαριθμική κλίμακα και η καμπύλη έχει σιγμοειδές σχήμα. Ωστόσο, μπορεί να φαίνεται γραμμική όταν χρησιμοποιείται μικρό εύρος προτύπων. Διορθώστε τις ποσότητες δειγμάτων ως προς τον παράγοντα αραίωσης και αναφέρατε την ποσότητα σε mg VTG/ml πλάσματος.

Προσδιορισμός των ελάχιστων ορίων ανίχνευσης (MDL)

Συχνά, ιδίως στα φυσιολογικά αρσενικά, δεν θα είναι σαφής ο τρόπος αναφοράς των αποτελεσμάτων από χαμηλές τιμές. Σε αυτές τις περιπτώσεις, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τα όρια εμπιστοσύνης 95 % προκειμένου να προσδιοριστεί εάν μια τιμή θα πρέπει να αναφερθεί ως μηδενική ή ως κάποιος άλλος αριθμός. Εάν το αποτέλεσμα του δείγματος βρίσκεται εντός της περιοχής του διαστήματος εμπιστοσύνης του μηδενικού προτύπου (B_0), το αποτέλεσμα θα πρέπει να αναφέρεται ως μηδενικό. Το ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης θα είναι το χαμηλότερο πρότυπο που είναι σταθερά διαφορετικό από το μηδενικό πρότυπο· με άλλα λόγια, τα δύο διαστήματα εμπιστοσύνης δεν επικαλύπτονται. Για οποιοδήποτε αποτέλεσμα δείγματος που βρίσκεται εντός των ορίων εμπιστοσύνης του ελάχιστου επιπέδου ανίχνευσης, ή πάνω από αυτό, θα αναφέρεται η υπολογισθείσα τιμή. Εάν ένα δείγμα βρίσκεται μεταξύ των διαστημάτων του μηδενικού προτύπου και του ελάχιστου επιπέδου ανίχνευσης, θα πρέπει να αναφέρεται το ήμισυ του ελάχιστου επιπέδου ανίχνευσης για την τιμή του εν λόγω δείγματος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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.

Προσάρτημα 7

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Από τη LAGDA προκύπτουν τρεις τύποι δεδομένων προς στατιστική ανάλυση: 1) ποσοτικά συνεχή δεδομένα, 2) δεδομένα χρόνου μέχρι τα συμβάντα για τους ρυθμούς ανάπτυξης (χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF) και 3) διατάξιμα δεδομένα υπό μορφή βαθμολογιών σοβαρότητας ή αναπτυξιακών σταδίων από ιστοπαθολογικές αξιολογήσεις. Στον πίνακα 1 φαίνεται το συνιστώμενο διάγραμμα αποφάσεων στατιστικής ανάλυσης για τη LAGDA. Επίσης, στη συνέχεια παρατίθενται ορισμένες σημειώσεις που μπορεί να είναι χρήσιμες για τη διεξαγωγή της στατιστικής ανάλυσης των μετρήσεων της LAGDA. Όσον αφορά το διάγραμμα αποφάσεων ανάλυσης, τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τη θνησιμότητα, τη σωματική αύξηση (βάρος και μήκος) και τον ηπατοσωματικό δείκτη (LSI) θα πρέπει να αναλύονται σύμφωνα με το σκέλος «Άλλες παράμετροι».

Συνεχή δεδομένα

Τα δεδομένα από συνεχείς παραμέτρους θα πρέπει πρώτα να ελέγχονται ως προς τη μονοτονικότητα μέσω μετασχηματισμού των δεδομένων κατά βαθμίδα, την προσαρμογή σε μοντέλο ANOVA και τη σύγκριση γραμμικών και τετραγωνικών αντιθέσεων. Εάν τα δεδομένα είναι μονοτονικά, θα πρέπει να εφαρμόζεται έλεγχος τάσεων Jonckheere-Terpstra αποκλιμάκωσης στις διάμεσες τιμές των πανομοιότυπων δειγμάτων, και δεν θα πρέπει να διενεργούνται επακόλουθες αναλύσεις. Μια εναλλακτική μέθοδος για δεδομένα που εμφανίζουν κανονική κατανομή με ομοιογενείς διασπορές είναι ο έλεγχος Williams αποκλιμάκωσης. Εάν τα δεδομένα δεν είναι μονοτονικά (η τετραγωνική αντίθεση είναι σημαντική και η γραμμική δεν είναι), θα πρέπει να αναλύονται με χρήση μοντέλου ANOVA μεικτών επιδράσεων. Στη συνέχεια, τα δεδομένα θα πρέπει να αξιολογούνται ως προς την κανονικότητα (κατά προτίμηση με χρήση του ελέγχου Shapiro-Wilk ή Anderson-Darling) και την ομοιογένεια της διασποράς (κατά προτίμηση με χρήση του ελέγχου Levene). Και οι δύο έλεγχοι εκτελούνται επί των καταλοίπων του μοντέλου ANOVA μεικτών επιδράσεων. Η γνώμη ενός ειδικού μπορεί να αντικαταστήσει αυτές τις τυπικές δοκιμασίες όσον αφορά την κανονικότητα και την ομοιογένεια της διασποράς, ωστόσο προτιμάται η διεξαγωγή τυπικών δοκιμασιών. Εάν τα δεδομένα εμφανίζουν κανονική κατανομή με ομοιογενή διασπορά, τότε οι παραδοχές του μοντέλου ANOVA μεικτών επιδράσεων επαληθεύονται και μια σημαντική επίδραση της αγωγής προσδιορίζεται με τον έλεγχο Dunnett. Σε περίπτωση μη κανονικότητας ή έλλειψης ομοιογένειας της διασποράς, οι παραδοχές του ελέγχου Dunnett παραβιάζονται και θα πρέπει να αναζητείται μετασχηματισμός κανονικοποίησης και σταθεροποίησης της διασποράς. Εάν δεν βρεθεί παρόμοιος μετασχηματισμός, τότε μια σημαντική επίδραση αγωγής προσδιορίζεται με έλεγχο Dunn. Όποτε είναι εφικτό, θα πρέπει να διενεργείται μονόπλευρος έλεγχος, σε αντίθεση με τον αμφίπλευρο έλεγχο, ο οποίος, ωστόσο, απαιτεί την κρίση ειδικού προκειμένου να προσδιοριστεί ποιος από τους δύο τύπους ελέγχου είναι ο κατάλληλος για μια δεδομένη παράμετρο.

Θνησιμότητα

Τα δεδομένα θνησιμότητας θα πρέπει να αναλύονται για τη χρονική περίοδο που περιλαμβάνει το σύνολο της δοκιμής, και θα πρέπει να εκφράζονται ως αναλογία ζώων που πέθαναν σε μια συγκεκριμένη δεξαμενή. Οι γυρίνοι που δεν ολοκληρώνουν το στάδιο της μεταμόρφωσης εντός του καθορισμένου χρονικού πλαισίου, οι γυρίνοι που ανήκουν στην κοόρτη υποδείγματος προνυμφών, οι νεαροί βάτραχοι που θανατώνονται επιλεκτικά και τυχόν ζώα που πεθαίνουν λόγω σφάλματος του πειραματιστή θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως λογοκριμένα δεδομένα και να μην περιλαμβάνονται στον παρονομαστή του υπολογισμού ποσοστών. Πριν από τη διενέργεια στατιστικών αναλύσεων, για τις αναλογίες θνησιμότητας θα πρέπει να εφαρμόζεται μετασχηματισμός τετραγωνικής ρίζας τόξου ημιτόνου. Μια εναλλακτική λύση είναι η χρήση του ελέγχου Cochran-Armitage αποκλιμάκωσης, πιθανώς με προσαρμογή Rao-Scott εάν υπάρχει υπερδιασπορά.

Βάρος και μήκος (δεδομένα σωματικής αύξησης)

Τα αρσενικά και τα θηλυκά δεν είναι σεξουαλικά διμορφικά κατά τη μεταμόρφωση και, κατά συνέπεια, τα δεδομένα σωματικής αύξησης του υποδείγματος προνυμφών θα πρέπει να αναλύονται ανεξάρτητα από το φύλο. Τα δεδομένα σωματικής αύξησης των νεαρών ατόμων, αντιθέτως, θα πρέπει να αναλύονται χωριστά με βάση το γενετικό φύλο. Για τις παραμέτρους αυτές μπορεί να χρειάζεται λογαριθμική προσαρμογή, δεδομένου ότι η λογαριθμική κανονικότητα των δεδομένων μεγέθους δεν είναι ασυνήθης.

Ηπατοσωματικός δείκτης (LSI)

Τα βάρη ήπατος θα πρέπει να κανονικοποιούνται ως αναλογία έναντι του βάρους ολόκληρου του σώματος (LSI) και να αναλύονται χωριστά με βάση το γενετικό φύλο.

Χρόνος μέχρι το στάδιο 62 κατά NF

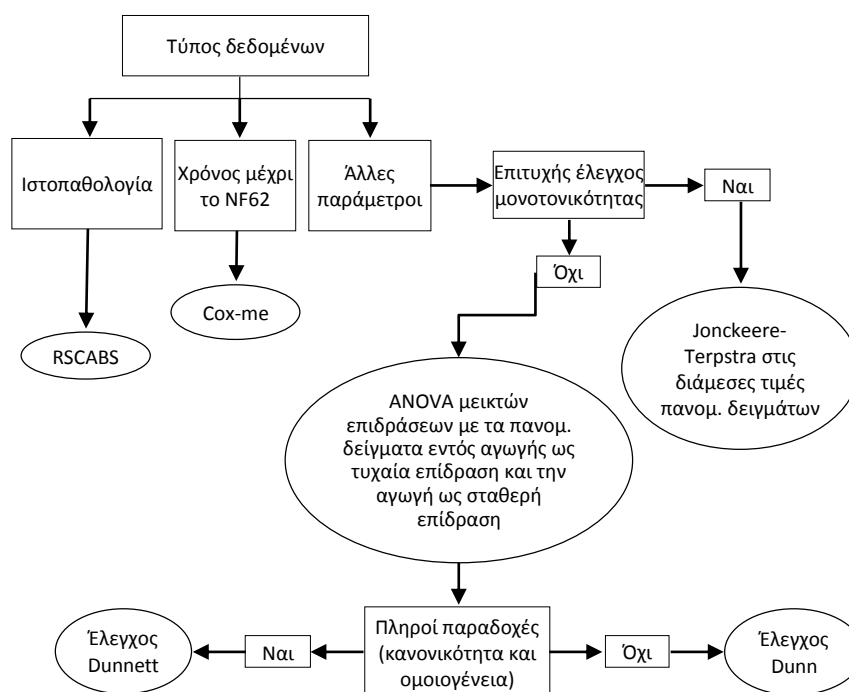
Τα δεδομένα για τον χρόνο μέχρι τη μεταμόρφωση θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δεδομένα για τον χρόνο έως τα συμβάντα, με τυχόν θανάτους ή άτομα που δεν φθάνουν στο στάδιο 62 κατά NF μέσα σε 70 ημέρες να αντιμετωπίζονται ως δεδομένα λογοκριμένα εκ δεξιών (δηλ. η πραγματική τιμή είναι μεγαλύτερη από 70 ημέρες αλλά η μελέτη σταματά προτού τα ζώα φθάσουν στο στάδιο 62 κατά NF σε 70 ημέρες). Ο διάμεσος χρόνος μέχρι την ολοκλήρωση της μεταμόρφωσης σταδίου 62 κατά NF στους μάρτυρες νερού αραίωσης θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ημερομηνίας λήξης της δοκιμής. Ο διάμεσος χρόνος μέχρι την ολοκλήρωση της μεταμόρφωσης μπορεί να προσδιορίζεται με εκτιμητές γινομένου-ορίου Kaplan-Meier. Η παράμετρος αυτή θα πρέπει να αναλύεται με χρήση μοντέλου αναλογικών κινδύνων Cox μεικτών επιδράσεων το οποίο λαμβάνει υπόψη τη δομή πανομοιότυπων δειγμάτων της μελέτης.

Δεδομένα ιστοπαθολογίας (βαθμολογίες σοβαρότητας και αναπτυξιακά στάδια)

Τα δεδομένα ιστοπαθολογίας έχουν μορφή βαθμολογιών σοβαρότητας ή αναπτυξιακών σταδίων. Ένας έλεγχος που καλείται RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) χρησιμοποιεί έλεγχο τάσεων Cochran-Armitage προσαρμοσμένο στον έλεγχο Rao-Scott

αποκλιμάκωσης σε κάθε επίπεδο σοβαρότητας μιας ιστοπαθολογικής απόκρισης (Green *et al.*, 2014). Με την προσαρμογή Rao-Scott ενσωματώνεται στον έλεγχο ο πειραματικός σχεδιασμός δοχείων πανομοιότυπων δειγμάτων. Η διαδικασία «κατά τομές» (by slices) συνεκτιμά τη βιολογική προσδοκία ότι η σοβαρότητα της επίδρασης τείνει να αυξάνεται όσο αυξάνονται οι δόσεις ή οι συγκεντρώσεις, ενώ ταυτόχρονα διατηρούνται οι βαθμολογίες των επιμέρους ατόμων και αποτυπώνεται η σοβαρότητα τυχόν διαπιστωθείσας επίδρασης. Η διαδικασία RSCABS προσδιορίζει όχι μόνο τις αγωγές που είναι στατιστικά διαφορετικές από τους μάρτυρες (δηλαδή εμφανίζουν σοβαρότερες παθολογικές καταστάσεις απ' ό,τι οι μάρτυρες), αλλά και τη βαθμολογία σοβαρότητας στην οποία έγκειται η διαφορά, παρέχοντας, κατ' αυτόν τον τρόπο, εξαιρετικά χρήσιμες πληροφορίες για την ανάλυση. Κατά τον προσδιορισμό του αναπτυξιακού σταδίου των γονάδων και των γεννητικών πόρων, θα πρέπει να εφαρμόζεται πρόσθετος χειρισμός των δεδομένων, καθώς μία παραδοχή της διαδικασίας RSCABS είναι ότι η σοβαρότητα της επίδρασης αυξάνεται με τη δόση. Η παρατηρούμενη επίδραση μπορεί να είναι μια καθυστέρηση ή επιτάχυνση της ανάπτυξης. Ως εκ τούτου, τα δεδομένα αναπτυξιακών σταδίων θα πρέπει να αναλύονται όπως έχουν αναφερθεί, ώστε να προσδιορίζεται η επιτάχυνση της ανάπτυξης, και στη συνέχεια να αντιστρέφονται με μη αυτόματο τρόπο πριν από τη διεξαγωγή δεύτερης ανάλυσης για τον προσδιορισμό τυχόν καθυστέρησης της ανάπτυξης.

Σχήμα 1: Διάγραμμα αποφάσεων στατιστικής ανάλυσης για τα δεδομένα LAGDA.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

Προσάρτημα 8

ΖΗΤΗΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΛΑΧΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΣΚΟΛΙΩΣΗΣ

Η ιδιοπαθής σκολίωση, η οποία εκδηλώνεται συνήθως ως κύρτωμα της ουράς στους γυρίνους *Xenopus laevis*, μπορεί να περιπλέξει τις μορφολογικές και συμπεριφορικές παρατηρήσεις επί των πληθυσμών της δοκιμής. Θα πρέπει να καταβάλλονται προσπάθειες για την ελαχιστοποίηση της συχνότητας εμφάνισης της σκολίωσης, τόσο στο απόθεμα όσο και υπό συνθήκες δοκιμής. Στην οριστική δοκιμή, συνιστάται ο επιπολασμός της μέτριας και της σοβαρής σκολίωσης να μην υπερβαίνει το 10 %, ώστε να βελτιωθεί η εμπιστοσύνη στην ικανότητα της δοκιμής να ανιχνεύει αναπτυξιακές επιδράσεις που σχετίζονται με την αγωγή σε κατά τα άλλα υγιείς προνύμφες αμφίβιων.

Στο πλαίσιο καθημερινών παρατηρήσεων στη διάρκεια της οριστικής δοκιμής θα πρέπει να καταγράφεται τόσο η συχνότητα εμφάνισης (μέτρηση ατόμων) όσο και η σοβαρότητα της σκολίωσης, όταν υπάρχει. Η φύση της ανωμαλίας θα πρέπει να περιγράφεται ως προς τη θέση (π.χ. μπροστά ή πίσω από την αμάρα) και ως προς την κατεύθυνση της κυρτότητας (π.χ. πλευρική ή ραχιαία/κοιλιακή). Η σοβαρότητα μπορεί να βαθμολογηθεί ως εξής:

(NR) Μη αξιοσημείωτη: δεν υπάρχει κυρτότητα

- 1) Ελάχιστη: ελαφριά, πλευρική κυρτότητα πίσω από την αμάρα· εμφανής μόνο κατά την ηρεμία
- 2) Μέτρια: πλευρική κυρτότητα πίσω από την αμάρα· διαρκώς ορατή αλλά δεν εμποδίζει την κίνηση
- 3) Σοβαρή: πλευρική κυρτότητα μπροστά από την αμάρα· Ή οποιαδήποτε κυρτότητα που εμποδίζει την κίνηση· Ή οποιαδήποτε ραχιαία/κοιλιακή κυρτότητα

Μια επιστημονική συμβουλευτική επιτροπή FIFRA της EPA των ΗΠΑ (FIFRA SAP 2013) μελέτησε συνοπτικά δεδομένα για τη σκολίωση σε δεκαπέντε δοκιμασίες μεταμόρφωσης αμφίβιων με τον *X. laevis* (στάδιο 51 έως 60+ κατά NF) και έδωσε γενικές συστάσεις για τη μείωση του επιπολασμού της ανωμαλίας αυτής στους πληθυσμούς δοκιμής. Οι συστάσεις αφορούν τη LAGDA, παρότι η συγκεκριμένη δοκιμή αφορά μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ανάπτυξης.

Ιστορικές επιδόσεις ωτοκίας

Γενικά, ως ζεύγη ζευγαρώματος θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή ενήλικα άτομα υψηλής ποιότητας· η εξάλειψη των ζευγών αναπαραγωγής που παράγουν απογόνους με σκολίωση μπορεί να ελαχιστοποιήσει τη συχνότητα εμφάνισης με την πάροδο του χρόνου. Ειδικότερα, η ελαχιστοποίηση της χρήσης αποθέματος αναπαραγωγής που έχει

αιχμαλωτιστεί από τη φύση μπορεί να αποδειχθεί ωφέλιμο μέτρο. Η περίοδος έκθεσης της LAGDA ξεκινά με έμβρυα σταδίου 8-10 κατά NF, και δεν είναι εφικτό να προσδιοριστεί κατά την έναρξη της δοκιμής το κατά πόσον συγκεκριμένα άτομα θα αναπτύξουν σκολίωση. Ως εκ τούτου, πέραν της παρακολούθησης της συχνότητας εμφάνισης της σκολίωσης σε ζώα που υποβάλλονται σε δοκιμή, θα πρέπει να τεκμηριώνονται και οι ιστορικές επιδόσεις εμβρύων της ίδιας μητέρας (περιλαμβανομένης της συχνότητας εμφάνισης της σκολίωσης σε τυχόν προνύμφες που αφέθηκαν να αναπτυχθούν). Μπορεί να είναι σκόπιμη η περαιτέρω παρακολούθηση τμήματος της κάθε ομάδας εμβρύων της ίδιας μητέρας που δεν χρησιμοποιείται σε συγκεκριμένη μελέτη και η αναφορά των σχετικών παρατηρήσεων (FIFRA SAP 2013).

Ποιότητα του νερού

Είναι σημαντικό να διασφαλίζεται η επαρκής ποιότητα του νερού, τόσο στο εργαστηριακό απόθεμα όσο και κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Πέραν των κριτηρίων ποιότητας του νερού που αξιολογούνται στο πλαίσιο της συνήθους πρακτικής αναφορικά με τις δοκιμές τοξικότητας για τους υδρόβιους οργανισμούς, μπορεί να είναι σκόπιμη η παρακολούθηση και η διόρθωση τυχόν ελλείψεων θρεπτικών συστατικών (π.χ. έλλειψη βιταμίνης C, ασβεστίου, φωσφόρου) ή υπερβολικών επιπέδων σεληνίου και χαλκού, τα οποία έχει αναφερθεί ότι προκαλούν σκολίωση ποικίλου βαθμού στα είδη *Rana* sp. και *Xenopus* sp. που εκτρέφονται στο εργαστήριο (Marshall *et al.* 1980, Leibovitz *et al.* 1992, Martinez *et al.* 1992, όπως αναφέρεται στο FIFRA SAP 2013). Η χρήση του κατάλληλου προγράμματος σίτισης (βλ. προσάρτημα 4) και ο τακτικός καθαρισμός των δεξαμενών βελτιώνουν κατά κανόνα την ποιότητα του νερού και της υγείας των ειδών δοκιμής.

Σιτηρέσιο

Συγκεκριμένες συστάσεις για πρόγραμμα σίτισης, το οποίο έχει διαπιστωθεί ότι είναι επιτυχές με τη LAGDA, περιλαμβάνονται αναλυτικά στο προσάρτημα 4. Συνιστάται οι πηγές τροφής να ελέγχονται για την ύπαρξη βιολογικών τοξινών, ζιζανιοκτόνων και άλλων φυτοφαρμάκων που είναι γνωστό ότι προκαλούν σκολίωση στον *X. laevis* ή σε άλλα υδρόβια ζώα (Schlenk και Jenkins 2013). Για παράδειγμα, η έκθεση σε ορισμένους αναστολείς της χολινεστεράσης έχει συσχετιστεί με σκολίωση στα ψάρια (Schultz *et al.* 1985) και τους βατράχους (Bacchetta *et al.* 2008).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and 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, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathrogenic effects of semicarbazide. *Toxicology* 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and 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, and 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, and P. Herraiez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314-320.

Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. May 21-23, 2013. Washington, DC.»