



Europeiska
unionens råd

Bryssel den 25 februari 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

FÖLJENOT

från:	Europeiska kommissionen
inkom den:	22 februari 2019
till:	Rådets generalsekretariat
Komm. dok. nr:	Annex to D060575/02
Ärende:	Bilaga till KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EU) .../... av den XXX om ändring, för anpassning till den tekniska utvecklingen, av bilagan till förordning (EG) nr 440/2008 om testmetoder enligt Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach)

För delegationerna bifogas dokument – Annex to D060575/02.

Bilaga: Annex to D060575/02

B.71 IN VITRO-TESTER AVSEENDE HUDSENSIBILISERING SOM BEHANDLAR NYCKELHÄNDELSEN AKTIVERING AV DENDRITISKA CELLER INOM AOP:N FÖR HUDSENSIBILISERING

ALLMÄN INLEDNING

Testmetod baserad på nyckelhändelsen aktivering av dendritiska celler

1. Hudsensibiliserande ämnen är ämnen som leder till en allergisk reaktion efter hudkontakt enligt definitionen i FN:s globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (1) och förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP-förordningen)¹. Det råder allmän enighet om de viktigaste biologiska händelserna (nyckelhändelserna) som utlöser hudsensibilisering. Den befintliga kunskapen om de kemiska och biologiska mekanismer som är förknippade med hudsensibilisering har sammanfattats i form av en AOP (Adverse Outcome Pathway) under OECD:s AOP-program (2), från den inledande molekylära händelsen, via de mellanliggande händelserna och fram till den skadliga effekten, närmare bestämt allergisk kontaktdermatit. I det här fallet är den inledande molekylära händelsen (det vill säga den första nyckelhändelsen) den kovalenta bindningen av elektrofila ämnen till nukleofila centrum i hudproteiner. Den andra nyckelhändelsen i AOP:n sker i keratinocyterna och innefattar inflammatoriska responser samt förändringar i genuttryck kopplade till specifika cellsignaleringsvägar, till exempel ARE-beroende vägar (Antioxidant/Electrophile Response Element). Den tredje nyckelhändelsen är aktiveringen av dendritiska celler, som vanligen bedöms utifrån uttrycket av specifika celllytemarkörer, kemokiner och cytokiner. Den fjärde nyckelhändelsen är aktiveringen och spridningen av T-celler, som bedöms indirekt genom LLNA-testet på mus (Local Lymph Node Assay) (3).
2. Den här testmetoden (TM) motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 442E (2017). Den beskriver in vitro-tester gällande mekanismer som beskrivs under nyckelhändelsen aktivering av dendritiska celler inom AOP:n för hudsensibilisering (2). Testmetoden utgörs

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

av tester som används för att understödja uppdelningen mellan hudsensibiliserande ämnen och icke-hudsensibiliserande ämnen i enlighet med GHS och CLP-förordningen.

Testerna som beskrivs i denna testmetod är följande:

- h-CLAT (Human Cell Line Activation Test).
 - U-SENSTM (aktiveringstest för cellinjen U937).
 - IL-8 Luc-testet (Interleukin-8 Reporter Gene Assay).
3. Testerna som ingår i denna testmetod och motsvarande OECD-testriktlinje kan skilja sig åt i fråga om förfarandet som används för att generera data och de avläsningar som uppmäts, men de kan användas utan åtskillnad för att uppfylla ländernas krav på testresultat avseende nyckelhändelsen aktivering av dendritiska celler inom AOP:n för hudsensibilisering, samtidigt som de omfattas av OECD:s rådslag om ömsesidigt erkännande av data (MAD).

Bakgrund och principer för testerna som ingår i den nyckelhändelsebaserade testmetoden

4. Bedömning av hudsensibilisering har normalt inbegripit användning av försöksdjur. I de klassiska metoder som använder sig av marsvin – Magnusson och Kligmans GPMT-test (Guinea Pig Maximisation Test) och Buehler-testet (TM B.6) (4) – bedöms både induktions- och eliciteringsfaserna i hudsensibiliseringen. I testerna på mus, LLNA (TM B.42) (3) och de båda icke-radioaktiva modifieringarna LLNA: DA (TM B.50) (5) och LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51) (6), bedöms endast induktionsresponsen och dessa tester har också vunnit erkännande eftersom de har djurskyddsmässiga fördelar framför marsvinstester och ger en objektiv mätning av hudsensibiliseringens induktionsfas.
5. På senare tid har mekanistiskt baserade in chemico- och in vitro-testmetoder som behandlar den första nyckelhändelsen (TM B.59; DPRA [Direct Peptide Reactivity Assay] [7]) och den andra nyckelhändelsen (TM B.60; testmetoden ARE-Nrf2-luciferas [8]) i AOP:n för hudsensibilisering antagits för att bidra till utvärderingen av kemikaliers hudsensibiliseringspotential.
6. Testerna som beskrivs i den här testmetoden kvantifierar antingen förändringar i uttrycket av cellytemarkörer (en eller flera) som är kopplade till aktiveringsprocessen för monocytter och dendritiska celler efter exponering för sensibiliserande ämnen (till exempel CD54 eller CD86) eller förändringar i uttrycket av IL-8, som är en cytokin kopplad till aktiveringen av dendritiska celler. Hudsensibiliserande ämnen har rapporterats ge upphov till uttryck av cellmembranmarkörer, som CD40, CD54, CD80, CD83 och CD86, i tillägg till pro-inflammatoriska cytokiner, som IL-1 β och TNF- α , och åtskilliga kemokiner, inklusive IL-8

(CXCL8) och CCL3, (9) (10) (11) (12) som är kopplade till aktiveringen av dendritiska celler (2).

7. Eftersom aktivering av dendritiska celler endast utgör en av nyckelhändelserna inom AOP:n för hudsensibilisering (2) (13), kan det emellertid hända att information som genereras genom tester som mäter markörer för aktivering av dendritiska celler inte på egen hand räcker för att man ska kunna avgöra huruvida kemikalier har eller inte har hudsensibiliseringspotential. Av den anledningen är data som genereras genom de tester som beskrivs i denna testmetod tänkta att understödja uppdelningen mellan hudsensibiliserande ämnen (det vill säga ämnen enligt kategori 1 i GHS/CLP-förordningen) och icke-hudsensibiliserande ämnen när de används inom ramen för en IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment), tillsammans med annan relevant kompletterande information, som exempelvis erhållits genom in vitro-tester som studerar andra nyckelhändelser inom AOP:n för hudsensibilisering och metoder som inte bygger på testning, vilket innefattar jämförelser med kemiskt analoga ämnen (13). Exempel på användning av data som genererats genom dessa tester inom ramen för definierade arbetssätt (Defined Approaches), det vill säga arbetsmetoder som är standardiserade både i fråga om de informationskällor som används och i fråga om förfarandet som tillämpas för att härleda prediktioner från dessa data, har publicerats (13) och kan användas som användbara element inom aktuell IATA.
8. Testerna som beskrivs inom denna testmetod kan inte användas som fristående tester, vare sig för att dela in hudsensibiliserande ämnen i underkategorierna 1A och 1B enligt definitionerna i GHS/CLP-förordningen, för myndigheter som använder sig av dessa båda frivilliga underkategorier, eller för att förutsäga styrkan när det handlar om säkerhetsbedömningsbeslut. Beroende på det tillämpliga regelverket kan dock positiva resultat som erhållits med dessa metoder användas fristående för att klassificera kemikalier i kategori 1 enligt GHS/CLP-förordningen.
9. I denna testmetod används begreppet *testkemikalie* endast för att syfta på det som testas¹ och begreppet berör inte testernas tillämplighet för att testa monokomponentämnen, multikomponentämnen och/eller blandningar. För närvarande finns endast begränsad information om testernas tillämplighet för multikomponentämnen/blandningar (14) (15).

¹ I juni 2013 enades det gemensamma mötet mellan OECD:s kemikaliekommitté och dess arbetsgrupp om kemikalier, bekämpningsmedel och bioteknik om att en mer enhetlig användning av termen *testkemikalie*, som en beskrivning av vad som testas, bör användas i nya och uppdaterade OECD-testriktlinjer, när så är möjligt.

Testerna är inte desto mindre tekniskt tillämpbara för att testa multikomponentämnen och blandningar. Innan testmetoden används för en blandning i syfte att samla in data för ett avsett tillsynsändamål bör man dock överväga om, och i så fall varför, testmetoden kommer att ge godtagbara resultat för detta ändamål¹. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste testas enligt lag. Vid testning av multikomponentämnen eller blandningar bör man även ta hänsyn till eventuella störningar orsakade av cytotoxiska beståndsdelar i de observerade responserna.

¹ Denna mening förslogs och godkändes vid WNT-mötet i april 2014.

LITTERATUR

- (1) Förenta nationerna (FN) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS, det globalt harmoniserade systemet för klassificering och märkning av kemikalier). Sjätte reviderade utgåvan. New York och Genève: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Finns på https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Finns på [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En).
- (3) Kapitel B.42 i denna bilaga: Hudsensibilisering: LLNA-metoden (Local Lymph Node Assay). Kapitel B.6 i denna bilaga: Hudsensibilisering.
- (4) Kapitel B.50 i denna bilaga: Hudsensibilisering: LLNA-metoden (Local Lymph Node Assay): DA.
- (5) Kapitel B.51 i denna bilaga: Hudsensibilisering: LLNA-metoden (Local Lymph Node Assay): BrdU-ELISA.
- (6) Kapitel B.59 i denna bilaga: Hudsensibilisering in chemico: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA).
- (7) Kapitel B.60 i denna bilaga: Hudsensibilisering in vitro: Testmetoden ARE-Nrf2-luciferas.
- (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 och 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 och 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 och 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](#), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris. Finns på <https://community.oecd.org/community/iatass>.
- (13) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (14) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

Tillägg 1

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

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

1. h-CLAT-testet kvantifierar förändringar i uttrycket av celllytemarkörer som är kopplade till aktiveringsprocessen för monocyter och dendritiska celler (det vill säga CD86 och CD54) i den humana cellinjen THP-1 (med ursprung i monocytisk leukemi) efter exponering för sensibiliserande ämnen (1) (2). De uppmätta uttrycksnivåerna för celllytemarkörerna CD86 och CD54 används sedan för att understödja uppdelningen mellan hudsensibiliserande ämnen och icke-hudsensibiliserande ämnen.
2. h-CLAT-testet har utvärderats i en valideringsstudie samordnad av Europeiska unionens referenslaboratorium för alternativ till djurförsök (EURL ECVAM) med efterföljande oberoende kollegial granskning av EURL ECVAM:s rådgivande vetenskapliga kommitté (ESAC, EURL ECVAM Scientific Advisory Committee). Med beaktande av alla tillgängliga bevis och inkomna åsikter från tillsynsmyndigheter och intressenter, rekommenderades h-CLAT-testet av EURL ECVAM (3) att användas som en del av en IATA för att understödja uppdelningen mellan hudsensibiliserande ämnen och icke-hudsensibiliserande ämnen för faroklassificering och -märkning. Exempel på användning av data från h-CLAT-test i kombination med annan information finns redovisade i litteraturen (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).
3. h-CLAT-testet har visat sig vara överförbart till laboratorier som har erfarenhet av cellodlingstekniker och flödescytometrisk analys. Testets förväntade reproducerbarhet i fråga om prediktioner är i storleksordningen 80 % inom och mellan laboratorier (3) (12). De erhållna resultaten i valideringsstudien (13) och andra publicerade studier (14) visar sammantaget att jämfört med LLNA-resultat är noggrannheten när det gäller att skilja mellan hudsensibiliserande ämnen (det vill säga kategori 1 enligt GHS/CLP-förordningen) och icke-hudsensibiliserande ämnen 85 % (N = 142), med en sensitivitet på 93 % (94/101) och en specificitet på 66 % (27/41) (baserat på en ny analys av EURL ECVAM [12] med beaktande av alla befintliga data och utan hänsyn tagen till negativa resultat för kemikalier med ett log K_{ow}-värde över 3,5, enligt beskrivningen i punkt 4). Det är mer sannolikt att falska negativa prediktioner med h-CLAT-testet gäller kemikalier som uppvisar en låg till måttlig hudsensibiliserande styrka (det vill säga underkategori 1B enligt GHS/CLP-förordningen) än kemikalier som uppvisar en hög hudsensibiliserande styrka (det vill säga underkategori 1A enligt GHS/CLP-förordningen) (4) (13) (15). Sammantaget visar informationen att h-CLAT-testet på ett användbart sätt bidrar till identifieringen av risker

för hudsensibilisering. De noggrannhetsvärden som anges här för h-CLAT-testet som ett fristående test är dock endast vägledande, eftersom testet bör beaktas i kombination med andra informationskällor inom ramen för en IATA och i enlighet med bestämmelserna i punkterna 7 och 8 i Allmän inledning. Vid utvärdering av tester utan djurförsök gällande hudsensibilisering bör man dessutom tänka på att såväl LLNA-testet som andra djurförsök eventuellt inte avspeglar situationen för människor fullt ut.

4. h-CLAT-testet har, baserat på de uppgifter som finns tillgängliga för närvarande, visat sig vara tillämpligt för testkemikalier som omfattar en rad olika organiska funktionella grupper, reaktionsmekanismer, hudsensibiliseringsstyrkor (vilket har fastställts i in vivo-undersökningar) och fysikalisk-kemiska egenskaper (3) (14) (15). h-CLAT-testet är tillämpligt för testkemikalier som är lösliga eller som bildar en stabil dispersion (det vill säga en kolloid eller en suspension i vilken testkemikalien inte sjunker till botten eller separeras från lösningsmedlet/vehikeln till olika faser) i ett lämpligt lösningsmedel/en lämplig vehikel (se punkt 14). Testkemikalier som har ett log K_{ow} -värde över 3,5 tenderar att ge falska negativa resultat (14). Negativa resultat som erhålls med testkemikalier med ett log K_{ow} -värde över 3,5 ska därför inte tas i beaktande. Positiva resultat som erhålls med testkemikalier med ett log K_{ow} -värde över 3,5 kan dock fortfarande användas som stöd för att identifiera testkemikalien som ett hudsensibiliserande ämne. På grund av den begränsade metaboliska kapaciteten hos den använda cellinjen (16) och testbetingelserna kan dessutom prohaptener (det vill säga ämnen som kräver enzymatisk aktivering, till exempel via P450-enzymen) och prehaptener (det vill säga ämnen som aktiveras av oxidation), i synnerhet om de har en långsam oxidationshastighet, också ge negativa resultat i h-CLAT-testet (15). Fluorescerande testkemikalier kan bedömas med h-CLAT-testet (17), men det bör noteras att kraftigt fluorescerande testkemikalier som sänder ut ljus med samma våglängd som fluoresceinisotiocyanat (FITC) eller propidiumjodid (PI) kommer att störa den flödescytometriska detekteringen och därför inte kan bedömas korrekt med användning av FITC-konjugerade antikroppar eller PI. I sådana fall kan andra fluorokrommärkta antikroppar respektive andra markörer för cytotoxicitet användas, så länge det kan visas att de ger liknande resultat som FITC-märkta antikroppar (se punkt 24) eller PI (se punkt 18), till exempel genom test av kvalifikationsämnena i tillägg 1.2. Mot bakgrund av det ovanstående bör negativa resultat tolkas utifrån de fastställda begränsningarna och tillsammans med andra informationskällor, inom ramen för en IATA. Om det finns bevis för att h-CLAT-testet inte är tillämpligt för andra specifika kategorier av testkemikalier, bör det inte användas för dessa specifika kategorier.
5. Som beskrivs ovan kan h-CLAT-testet användas för att understödja uppdelningen mellan hudsensibiliserande ämnen och icke-hudsensibiliserande ämnen. Eventuellt kan testet även bidra till bedömningen av sensibiliseringens styrka (4) (5) (9) när det används i integrerade arbetssätt, exempelvis en IATA. Det krävs dock ytterligare arbete, företrädesvis baserat på

data gällande människor, för att avgöra hur h-CLAT-resultat skulle kunna ligga till grund för en bedömning av sensibiliseringens styrka.

6. Definitioner av begrepp finns i tillägg 1.1.

TESTETS PRINCIP

7. h-CLAT-testet är ett in vitro-test som kvantifierar förändringar i uttrycket av cellytemarkörer (det vill säga CD86 och CD54) hos celler från den humana cellinjen THP-1 (med ursprung i monocytisk leukemi), efter 24 timmars exponering för testkemikalien. Dessa ytmolekyler är typiska markörer för monocytisk THP-1-aktivering och kan efterlikna aktiveringen av dendritiska celler, som spelar en avgörande roll vid priming av T-celler. Förändringarna i uttrycket av cellytemarkörer mäts genom flödescytometri efter infärgning av cellerna med fluorokrommärkta antikroppar. Mätningar av cytotoxiciteten utförs också parallellt för att bedöma huruvida uppregleringar av uttrycket av cellytemarkörer förekommer vid subcytotoxiska koncentrationer. Den relativa fluorescensintensiteten hos ytmarkörerna jämfört med lösningsmedels-/vehikelkontrollen beräknas och används i prediktionsmodellen (se punkt 26) för att understödja uppdelningen mellan hudsensibiliserande ämnen och icke-hudsensibiliserande ämnen.

DEMONSTRATION AV KOMPETENS

8. Innan testet som beskrivs i detta tillägg till testmetod B.71 används rutinmässigt, bör laboratoriet visa sin tekniska kompetens med användning av de tio kvalifikationsämnen som anges i tillägg 1.2. Dessutom bör användare av testet föra en historisk databas över data som erhålls genom reaktivitetskontrollerna (se punkt 11) och genom de positiva kontrollerna och lösningsmedels-/vehikelkontrollerna (se punkterna 20–22) och använda dessa data för att styrka att testets reproducerbarhet bibehålls i laboratoriet över tid.

FÖRFARANDE

9. Det här testet är baserat på h-CLAT DB-ALM-protokoll (DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation) nr 158 (18), som är det protokoll som användes för den EURL ECVAM-samordnade valideringsstudien. Det rekommenderas att detta protokoll tillämpas när h-CLAT-testet införs och används i laboratoriet. Nedan följer en beskrivning av de viktigaste delarna i och förfarandena för h-CLAT-testet, som utgörs av två steg: *ett dosfinnande test* och *en mätning av CD86/CD54-uttryck*.

Förberedelse av celler

10. Den humana cellinjen THP-1 (med ursprung i monocytisk leukemi) ska användas vid utförandet av h-CLAT-testet. Det rekommenderas att celler (TIB-202™) erhålls från en välmeriterad cellbank, exempelvis American Type Culture Collection.
11. THP-1-celler odlas, vid 37 °C i en fuktad atmosfär med 5 % CO₂, i RPMI-1640-medium som har kompletterats med 10 % fetalt bovint serum (FBS), 0,05 mM 2-merkaptoetanol, 100 enheter/ml penicillin och 100 µg/ml streptomycin. Om så önskas går det att utelämna användningen av penicillin och streptomycin i odlingsmediet. I sådana fall ska dock användarna verifiera att frånvaron av antibiotika i odlingsmediet inte har någon inverkan på resultaten, till exempel genom att testa de kvalifikationsämnen som anges i tillägg 1.2. För att minimera risken för föroreningar ska, under alla omständigheter, goda rutiner för cellodling följas, oberoende av om antibiotika ingår i cellodlingsmediet eller inte. THP-1-celler sås regelbundet ut, varannan till var tredje dag, med en densitet på 0,1 till 0,2 × 10⁶ celler/ml. Cellernas densitet bör hållas mellan 0,1 och 1,0 × 10⁶ celler/ml. Innan de används för testning bör cellerna genomgå en kvalificering i form av en reaktivitetskontroll. Reaktivitetskontrollen av cellerna bör utföras med användning av de positiva kontrollerna 2,4-dinitroklorbensen (DNCB) (CAS-nr 97-00-7, ≥ 99 % renhet) och nickelsulfat (NiSO₄) (CAS-nr 10101-97-0, ≥ 99 % renhet) och den negativa kontrollen mjölksyra (LA) (CAS-nr 50-21-5, ≥ 85 % renhet), vilket ska ske två veckor efter upptining. Såväl DNCB som NiSO₄ ska ge positiv respons för både cellytemarkören CD86 och cellytemarkören CD54, och LA ska ge negativ respons för både cellytemarkören CD86 och cellytemarkören CD54. Endast celler som har klarat reaktivitetskontrollen ska användas för testet. Celler kan förökas upp till två månader efter upptining. Antalet passager bör inte överstiga 30. Reaktivitetskontrollen bör utföras i enlighet med de förfaranden som beskrivs i punkterna 20–24.
12. För testet sås THP-1-celler ut med en densitet på antingen 0,1 × 10⁶ celler/ml eller 0,2 × 10⁶ celler/ml, varefter de förödlas i odlingsflaskor under 72 timmar respektive 48 timmar. Det är viktigt att celldensiteten i odlingsflaskan direkt efter förödlingsperioden är så likartad som möjligt för varje experiment (genom användning av en av de båda förödlingsbetingelser som beskrivs ovan), eftersom celldensiteten i odlingsflaskan direkt efter förödlingen kan påverka det allergeninducerade uttrycket av CD86/CD54 (19). På testdagen resuspenderas de skördade cellerna från odlingsflaskorna med nytt odlingsmedium, så att en koncentration på 2 × 10⁶ celler/ml erhålls. Därefter fördelas cellerna i en flatbottnad 24-hålsplatta med 500 µl per brunn (1 × 10⁶ celler/brunn) eller en flatbottnad 96-hålsplatta med 80 µl per brunn (1,6 × 10⁵ celler/brunn).

Dosfinnande test

13. Ett *dosfinnande test* utförs för att fastställa CV75-värdet, som är den koncentration av testkemikalien som resulterar i 75 % cellviabilitet (CV) jämfört med lösningsmedels-

/vehikelkontrollen. CV75-värdet används för att fastställa testkemikaliekoncentrationen för mätningen av *CD86/CD54*-uttrycket (se punkterna 20–24).

Beredning av testkemikalier och kontrollämnen

14. Testkemikalierna och kontrollämnena bereds på testdagen. För h-CLAT-testet löses testkemikalierna upp eller dispergeras i en stabil dispersion (se även punkt 4) i saltlösning eller medium som primärt lösningsmedels-/vehikelalternativ eller dimetylsulfoxid (DMSO, ≥ 99 % renhet) som sekundärt lösningsmedels-/vehikelalternativ om testkemikalien inte är löslig eller inte bildar en stabil dispersion i de tidigare båda lösningsmedlen/vehiklarna, till en slutlig koncentration på 100 mg/ml (i saltlösning eller medium) eller 500 mg/ml (i DMSO). Andra lösningsmedel/vehiklar än de som beskrivs ovan kan användas om en tillfredsställande vetenskaplig motivering tillhandahålls. Testkemikalien's stabilitet i det slutliga lösningsmedlet/den slutliga vehikeln ska tas i beaktande.
15. Med utgångspunkt i testkemikaliernas stamlösningar på 100 mg/ml (i saltlösning eller medium) eller 500 mg/ml (i DMSO) ska följande utspädningssteg utföras:
 - För saltlösning eller medium som lösningsmedel/vehikel: Åtta stamlösningar (åtta koncentrationer) bereds, genom tvåfaldiga serieutspädningssteg med användning av motsvarande lösningsmedel/vehikel. Dessa stamlösningar späds sedan vidare 50-faldigt i odlingsmedium (arbetslösningar). Om den högsta slutliga koncentrationen i plattan på 1 000 $\mu\text{g/ml}$ är icke-toxisk, ska den maximala koncentrationen fastställas på nytt genom att ett nytt cytotoxicitetstest utförs. Den slutliga koncentrationen i plattan bör inte överstiga 5 000 $\mu\text{g/ml}$ för testkemikalier som är upplösta eller dispergerade i en stabil dispersion i saltlösning eller medium.
 - För DMSO som lösningsmedel/vehikel: Åtta stamlösningar (åtta koncentrationer) bereds, genom tvåfaldiga serieutspädningssteg med användning av motsvarande lösningsmedel/vehikel. Dessa stamlösningar späds sedan vidare 250-faldigt i odlingsmedium (arbetslösningar). Den slutliga koncentrationen i plattan bör inte överstiga 1 000 $\mu\text{g/ml}$, inte ens om denna koncentration är icke-toxisk.

Arbetslösningarna används slutligen för exponeringen genom att en lika stor volym arbetslösning som volymen THP-1-cellsuspension tillsätts till plattan (se även punkt 17), vilket ger en ytterligare tvåfaldig spädning (normalt är det slutliga intervallet av koncentrationer i plattan 7,81–1 000 $\mu\text{g/ml}$).

16. Lösningsmedels-/vehikelkontrollen som används i h-CLAT-testet utgörs av odlingsmedium (för testkemikalier som är upplösta eller dispergerade i en stabil dispersion [se punkt 4] i antingen medium eller saltlösning) eller DMSO (för testkemikalier som är upplösta eller dispergerade i en stabil dispersion i DMSO) som testas vid en enda slutlig

koncentration i plattan på 0,2 %. Kontrollen genomgår samma utspädning som beskrivs för arbetslösningar i punkt 15.

Applicering av testkemikalier och kontrollämnen

17. Odlingsmediet eller arbetslösningar som beskrivs i punkterna 15 och 16 blandas 1:1 (volymförhållande) med de cellsuspensioner som beretts i den flatbottnade 24- eller 96-hålsplattan (se punkt 12). De behandlade plattorna inkuberas därefter i $24 \pm 0,5$ timmar vid 37°C i en atmosfär med 5 % CO_2 . Se till att flyktiga testkemikalier inte avdunstar och att det inte sker någon korskontaminering mellan testkemikalier i olika brunnar, till exempel genom att plattan förseglas innan testkemikalierna inkuberas (20).

Infärgning med propidiumjodid (PI)

18. Efter $24 \pm 0,5$ timmars exponering överförs cellerna till provrör och samlas upp genom centrifugering. Supernatanterna kasseras och de kvarvarande cellerna resuspenderas med 200 μl (vid användning av en 96-hålsplatta) eller 600 μl (vid användning av en 24-hålsplatta) av en fosfatbuffrad saltlösning som innehåller 0,1 % bovint serumalbumin (infärgningsbuffert). 200 μl cellsuspension överförs till en rundbottnad 96-hålsplatta (vid användning av en 96-hålsplatta) eller mikrorör (vid användning av en 24-hålsplatta) och tvättas två gånger med 200 μl (vid användning av en 96-hålsplatta) eller 600 μl (vid användning av en 24-hålsplatta) infärgningsbuffert. Slutligen resuspenderas cellerna i infärgningsbuffert (till exempel 400 μl) varpå PI-lösning (till exempel 20 μl) tillsätts (den slutliga koncentrationen PI kan till exempel vara 0,625 $\mu\text{g/ml}$). Andra cytotoxicitetsmarkörer, som 7-aminoaktinomycin D (7-AAD), trypanblått eller annan markör, kan användas om det kan visas att den alternativa infärgningen ger liknande resultat som PI, till exempel genom test av kvalifikationsämnena i tillägg 1.2.

Cytotoxicitetsmätning genom flödescytometri och uppskattning av CV75-värdet

19. Upptaget av PI analyseras med hjälp av flödescytometri, med användning av fluorescenskanalen FL-3. Totalt 10 000 levande celler (PI-negativa) mäts. Cellviabiliteten kan beräknas av cytometriundersökningens analysprogram med användning av nedanstående formel. Om cellviabiliteten är låg bör upp till 30 000 celler, inklusive döda celler, mätas. Alternativt kan data samlas in under en minut från det att analysen påbörjas.

$$\text{Cellviabilitet} = \frac{\text{Antal levande celler}}{\text{Totalt antal registrerade celler}} \times 100$$

CV75-värdet (se punkt 13), det vill säga en koncentration som uppvisar 75 % överlevnad hos THP-1-cellerna (25 % cytotoxicitet), beräknas genom log-linjär interpolering med användning av följande formel:

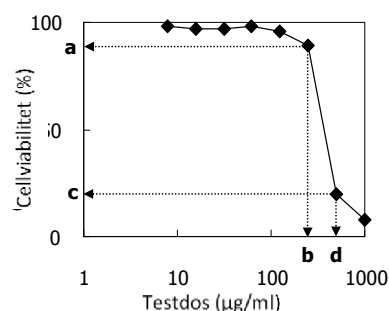
$$\text{Log CV75} = \frac{(75-c) \times \text{Log}(b) - (75-a) \times \text{Log}(d)}{a-c}$$

där

a är minimivärdet för en cellviabilitet över 75 %,

c är maximivärdet för en cellviabilitet under 75 %,

b och d är koncentrationerna som ger upphov till cellviabilitetsvärdena a respektive c.



Andra metoder för att få fram CV75-värdet kan användas så länge det kan visas att detta inte har någon inverkan på resultaten (till exempel genom test av kvalifikationsämnen).

Mätning av CD86/CD54-uttryck

Beredning av testkemikalier och kontrollämnen

20. Lämpligt lösningsmedel/lämplig vehikel (saltlösning, medium eller DMSO, se punkt 14) används för att lösa upp testkemikalierna eller dispergera dem i en stabil dispersion. Testkemikalierna späds först till den koncentration som motsvarar 100-faldig (för saltlösning eller medium) eller 500-faldig (för DMSO) koncentration i förhållande till $1,2 \times \text{CV75}$ -värdet som fastställdes i det *dosfinnande testet* (se punkt 19). Om CV75-värdet inte kan fastställas (det vill säga om tillräcklig cytotoxicitet inte kan observeras i det *dosfinnande testet*), ska den högsta lösliga eller stabilt dispergerade koncentrationen av testkemikalien som beretts med varje lösningsmedel/vehikel användas som startkoncentration. Observera att den slutliga koncentrationen i plattan inte bör överstiga 5 000 µg/ml (för saltlösning eller medium) eller 1 000 µg/ml (för DMSO). Därefter görs 1,2-faldiga serieutspädningar med användning av motsvarande lösningsmedel/vehikel för att erhålla de stamlösningar (åtta koncentrationer som sträcker sig från $100 \times 1,2 \times \text{CV75}$ till $100 \times 0,335 \times \text{CV75}$ [för saltlösning eller medium] eller från $500 \times 1,2 \times \text{CV75}$ till $500 \times 0,335 \times \text{CV75}$ [för DMSO]) som ska testas med h-CLAT-testet (se DB ALM-protokoll nr 158 för ett exempel på doseringsprocedur). Stamlösningarna späds sedan vidare 50-faldigt (för saltlösning eller medium) eller 250-faldigt (för DMSO) i odlingsmediet (arbetslösningar). Dessa arbetslösningar används slutligen för exponeringen med en ytterligare avslutande tvåfaldig utspädningsfaktor i plattan. Om resultaten inte uppfyller acceptanskriterierna som beskrivs i punkterna 29 och 30 i fråga om cellviabilitet,

kan det *dosfinnande testet* upprepas för att fastställa ett mer exakt CV75-värde. Observera att endast 24-hålsplattor kan användas för mätningen av CD86/CD54-uttryck.

21. Lösningsmedels-/vehikelkontrollen bereds enligt beskrivningen i punkt 16. Den positiva kontroll som används i h-CLAT-testet utgörs av DNCB (se punkt 11), för vilken stamlösningar bereds i DMSO och späds enligt beskrivningen för stamlösningar i punkt 20. DNCB bör användas som positiv kontroll för *mätning av CD86/CD54-uttryck* i en enda slutlig koncentration i plattan (normalt 4,0 µg/ml). För att uppnå en koncentration på 4,0 µg/ml DNCB i plattan bereds en stamlösning med 2 mg/ml DNCB i DMSO, som sedan späds vidare 250-faldigt med odlingsmedium till en arbetslösning på 8 µg/ml. Alternativt kan även CV75-värdet för DNCB, som fastställs inom varje testanläggning, användas som koncentration för positiv kontroll. Andra lämpliga positiva kontroller kan användas om historiska data finns att tillgå för att härleda jämförbara acceptanskriterier. För positiva kontroller bör den slutliga och enda koncentrationen i plattan inte överstiga 5 000 µg/ml (för saltlösning eller medium) eller 1 000 µg/ml (för DMSO). Acceptanskriterierna är desamma som de som beskrivs för testkemikalien (se punkt 29), förutom vad gäller det sista acceptanskriteriet eftersom den positiva kontrollen testas vid endast en koncentration.

Applicering av testkemikalier och kontrollämnen

22. För varje testkemikalie och kontrollämne krävs ett experiment för att erhålla en prediktion. Varje experiment består av åtminstone två oberoende testomgångar för *mätning av CD86/CD54-uttryck* (se punkterna 26–28). De oberoende testomgångarna ska utföras på olika dagar, alternativt på samma dag under förutsättning att följande gäller för varje testomgång: a) oberoende färskstamlösningar och arbetslösningar av testkemikalien och antikroppslösningar bereds och b) oavhängigt skördade celler används (det vill säga celler hämtas från olika odlingsflaskor); cellerna får dock komma från samma passage. Testkemikalier och kontrollämnen som beretts som arbetslösningar (500 µl) blandas med 500 µl suspenderade celler (1×10^6 celler) i förhållandet 1:1, varpå cellerna inkuberas i $24 \pm 0,5$ timmar enligt beskrivningen i punkterna 20 och 21. För varje testomgång räcker det med ett enda replikat för varje koncentration av testkemikalien och kontrollämnet, eftersom en prediktion erhålls från åtminstone två oberoende testomgångar.

Cellinfärgning och analys

23. Efter $24 \pm 0,5$ timmars exponering överförs cellerna från 24-hålsplattan till provrör, samlas upp genom centrifugering och tvättas sedan två gånger med 1 ml infärgningsbuffert (vid behov kan ytterligare tvättsteg genomföras). Efter tvättningen blockeras cellerna med 600 µl blockeringslösning (infärgningsbuffert innehållande 0,01 % [vikt/volym] globulin [Cohn-fraktion II, III från människa; SIGMA, nr G2388-10G eller motsvarande]) och inkuberas vid 4 °C i 15 minuter. Efter blockeringen delas cellerna upp i tre alikvoter om 180 µl i en rundbottenad 96-hålsplatta eller mikrorör.

24. Efter centrifugering färgas cellerna med 50 µl FITC-märkta antikroppar av typ anti-CD86, anti-CD54 eller IgG1 från mus (isotyp) vid 4 °C under 30 minuter. Antikropparna som beskrivs i h-CLAT DB-ALM-protokoll nr 158 (18) bör användas genom utspädning 3:25 (volymförhållande) (för CD86 [BD-PharMingen, nr 555657; klon: Fun-1]) eller 3:50 (volymförhållande) (för CD54 [DAKO, nr F7143; klon: 6.5B5] och IgG1 [DAKO, nr X0927]) med infärgningsbuffert. Dessa utspädningsfaktorer för antikropparna har definierats av testutvecklarna som de som ger det bästa signal-brusförhållandet. Enligt testutvecklarnas erfarenhet är fluorescensintensiteten hos antikropparna vanligtvis likartad mellan olika satser. Användarna kan dock överväga att titrera antikropparna under de egna laboratorieförhållandena för att få fram de bästa användningskoncentrationerna. Andra fluorokrommärkta antikroppar av typ anti-CD86 och/eller anti-CD54 kan användas om det kan visas att de ger liknande resultat som FITC-konjugerade antikroppar, till exempel genom test av kvalifikationsämnena i tillägg 1.2. Det bör noteras att byte av klon eller leverantör av antikropparna, enligt beskrivningen i h-CLAT DB-ALM-protokoll nr 158 (18), kan påverka resultaten. Efter två eller flera tvättar med 150 µl infärgningsbuffert resuspenderas cellerna i infärgningsbuffert (till exempel 400 µl) och PI-lösningen (till exempel 20 µl för att erhålla en slutlig koncentration på 0,625 µg/ml) eller en annan lösning med en cytotoxicitetsmarkör (se punkt 18) tillsätts. Uttrycksnivåerna för CD86 och CD54 och cellviabiliteten analyseras med hjälp av flödescytometri.

DATA OCH RAPPORTERING

Utvärdering av data

25. Uttrycket av CD86 och CD54 analyseras genom flödescytometri med användning av fluorescenskanalen FL-1. Baserat på det geometriska medelvärdet för fluorescensintensiteten (MFI) beräknas den relativa fluorescensintensiteten (RFI) för CD86 och CD54 för celler använda för positiv kontroll och kemikaliebehandlade celler enligt följande formel:

$$RFI = \frac{MFI \text{ för kemikaliebehandlade celler} - MFI \text{ för kemikaliebehandlade isotyp-kontrollceller}}{MFI \text{ för lösningsmedels-/vehikelbehandlade kontrollceller} - MFI \text{ för lösningsmedels-/vehikelbehandlade isotyp-kontrollceller}} \times 100$$

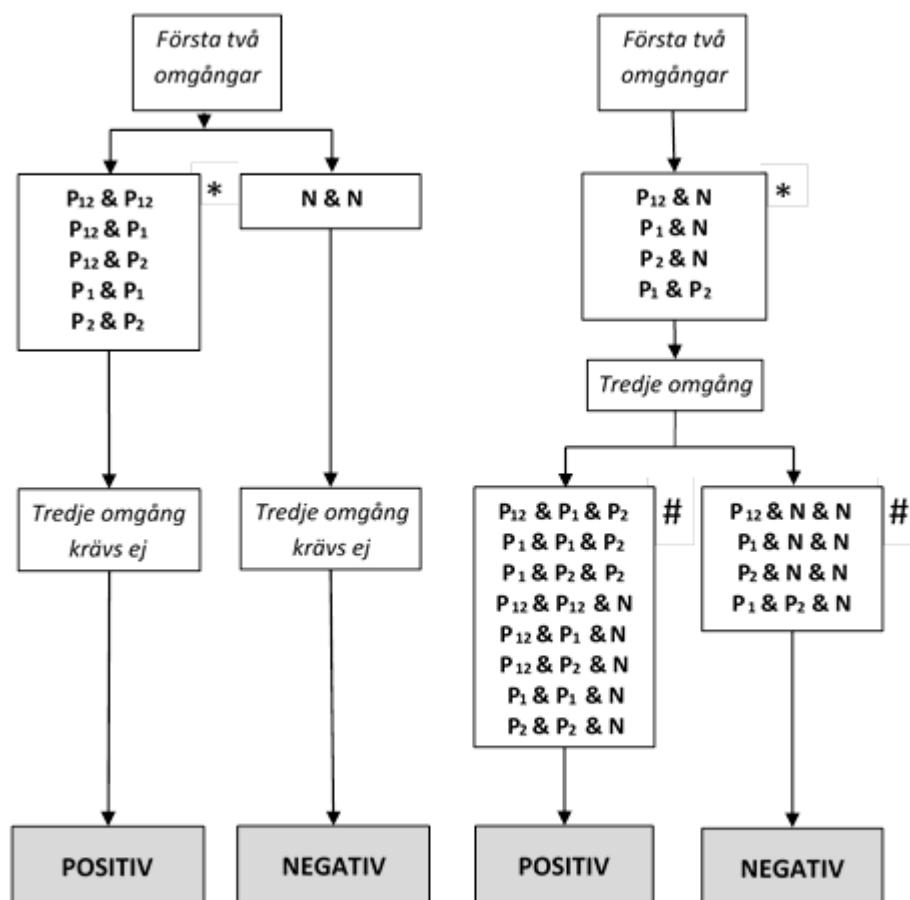
Cellviabiliteten för isotyp-kontrollcellerna (som är färgade med IgG1-antikroppar från mus [isotyp]) beräknas också enligt den formel som beskrivs i punkt 19.

Prediktionsmodell

26. För mätningen av *CD86/CD54*-uttryck testas varje testkemikalie i minst två oberoende testomgångar för att få fram en enda prediktion (POSITIV eller NEGATIV). En h-CLAT-prediktion anses vara POSITIV om åtminstone ett av följande villkor uppfylls i två av två, eller i åtminstone två av tre, oberoende testomgångar; i annat fall anses h-CLAT-prediktionen vara NEGATIV (figur 1):

- RFI-värdet för CD86 är lika med eller större än 150 % vid någon testad koncentration (med cellviabilitet ≥ 50 %).
 - RFI-värdet för CD54 är lika med eller större än 200 % vid någon testad koncentration (med cellviabilitet ≥ 50 %).
27. Baserat på ovanstående gäller att om båda de första två testomgångarna är positiva för CD86 och/eller för CD54 anses h-CLAT-prediktionen vara POSITIV och någon tredje testomgång behöver inte genomföras. På motsvarande sätt gäller att om de första två testomgångarna är negativa för båda markörerna anses h-CLAT-prediktionen vara NEGATIV (med hänsyn tagen till bestämmelserna i punkt 30) utan att någon tredje testomgång behöver genomföras. Om de första två testomgångarna emellertid inte ger samma resultat för minst en av markörerna (CD54 eller CD86), krävs en tredje testomgång och den slutliga prediktionen baseras då på majoritetsresultatet för de tre enskilda testomgångarna (det vill säga två av tre). I detta sammanhang bör det noteras att om två oberoende testomgångar genomförs och en endast är positiv för CD86 (nedan kallat P_1) och den andra endast är positiv för CD54 (nedan kallat P_2) krävs en tredje testomgång. Om denna tredje testomgång är negativ för båda markörerna (nedan kallat N) anses h-CLAT-prediktionen vara NEGATIV. Om å andra sidan den tredje testomgången är positiv för någon av markörerna (P_1 eller P_2) eller för båda markörerna (nedan kallat P_{12}) anses h-CLAT-prediktionen vara POSITIV.

Figur 1: Prediktionsmodell som används för h-CLAT-testet. En h-CLAT-prediktion bör beaktas inom ramen för en IATA och i enlighet med bestämmelserna i punkterna 7 och 8 i Allmän inledning.



P₁: testomgång med endast CD86 positiv, P₂: testomgång med endast CD54 positiv, P₁₂: testomgång med både CD86 och CD54 positiva, N: testomgång med varken CD86 eller CD54 positiva.

* Rutorna visar de relevanta kombinationerna av resultat från de första två testomgångarna, oberoende av i vilken ordning de kan ha erhållits.

Rutorna visar de relevanta kombinationerna av resultat från de tre testomgångarna baserat på resultaten från de första två testomgångarna i rutan ovanför, men återspeglar inte den ordning i vilken de kan ha erhållits.

28. För testkemikalier som predikteras vara POSITIVA med h-CLAT-testet kan, om så önskas, två EC-värden (effektiv koncentration) fastställas, EC150 för CD86 och EC200 för CD54, det vill säga de koncentrationer vid vilka testkemikalierna ger upphov till ett RFI-värde på 150 eller 200. Dessa EC-värden kan potentiellt bidra till bedömningen av sensibiliseringsstyrka (9) när de används i integrerade arbetssätt, som exempelvis en IATA (4) (5) (6) (7) (8). De kan beräknas med hjälp av följande formler:

$$EC_{150} \text{ (för CD86)} = B_{konc} + [(150 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{konc} - B_{konc})]$$

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

där

A_{konc} är den lägsta koncentration i µg/ml vid vilken RFI > 150 (CD86) eller 200 (CD54),

B_{konc} är den högsta koncentration i µg/ml vid vilken RFI < 150 (CD86) eller 200 (CD54),

A_{RFI} är RFI-värdet vid den lägsta koncentration vid vilken RFI > 150 (CD86) eller 200 (CD54),

B_{RFI} är RFI-värdet vid den högsta koncentration vid vilken RFI < 150 (CD86) eller 200 (CD54).

För att få fram mer exakta EC150- och EC200-värden kan tre oberoende testomgångar för *mätning av CD86/CD54-uttryck* krävas. De slutliga EC150- och EC200-värdena fastställs sedan som medianvärdet för EC-värdena som räknats fram utifrån de tre oberoende testomgångarna. Om endast två av tre oberoende testomgångar uppfyller kriterierna för positivt resultat (se punkterna 26–27) används det högre EC150- eller EC200-värdet av de två beräknade värdena.

Acceptanskriterier

29. Följande acceptanskriterier ska vara uppfyllda vid användning av h-CLAT-testet (22) (27):

- Cellviabiliteten ska vara högre än 90 % för medium- och lösningsmedels-/vehikelkontrollerna.
- I lösningsmedels-/vehikelkontrollen får inte RFI-värdena för vare sig CD86 eller CD54 överstiga kriterierna för positivt resultat (CD86 RFI ≥ 150 % och CD54 RFI ≥ 200 %). RFI-värdena för lösningsmedels-/vehikelkontrollen beräknas med användning av formeln som beskrivs i punkt 25 ("MFI för kemikalie" ska bytas ut mot "MFI för lösningsmedel/vehikel" och "MFI för lösningsmedel/vehikel" ska bytas ut mot "MFI för [medium-] kontroll").
- För såväl medium- som lösningsmedels-/vehikelkontrollerna ska MFI-förhållandet för både CD86 och CD54 gentemot isotypkontrollen vara > 105 %.
- I den positiva kontrollen (DNCB) ska RFI-värdena för både CD86 och CD54 uppfylla kriterierna för positivt resultat (CD86 RFI ≥ 150 och CD54 RFI ≥ 200) och cellviabiliteten ska vara högre än 50 %.
- För testkemikalien ska cellviabiliteten vara högre än 50 % i minst fyra testade koncentrationer i varje testomgång.

30. Negativa resultat godtas endast för testkemikalier som uppvisar en cellviabilitet som är lägre än 90 % vid den högsta testade koncentrationen (det vill säga $1,2 \times CV75$ enligt den procedur för serieutspädning som beskrivs i punkt 20). Om cellviabiliteten vid $1,2 \times CV75$

är lika med eller högre än 90 % ska det negativa resultatet förkastas. När så är fallet rekommenderas det att man försöker förfinas dosvalet genom att upprepa fastställandet av CV75-värdet. Det bör noteras att när 5 000 µg/ml i saltlösning (eller medium eller andra lösningsmedel/vehiklar), 1 000 µg/ml i DMSO eller den högsta lösliga koncentrationen används som maximal testkoncentration för en testkemikalie är ett negativt resultat godtagbart även om cellviabiliteten är över 90 %.

Testrapport

31. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie

Monokomponentämne:

- Kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel och/eller andra identifieringar.
- Fysiskt utseende, log K_{ow} , vattenlöslighet, löslighet i DMSO, molekylvikt och andra relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Renhet, kemisk identitet för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.
- Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning eller finfördelning).
- Testad koncentration/testade koncentrationer.
- Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Motivering för valet av lösningsmedel/vehikel för varje testkemikalie.

Multikomponentämne, UVCB och blandning:

- Karakteriseras så långt det är möjligt genom exempelvis kemisk identitet (se ovan), renhet, kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper (se ovan) hos beståndsdelarna, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Fysiskt utseende, vattenlöslighet, löslighet i DMSO och andra relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Molekylvikt eller uppskattad molekylvikt för blandningar/polymerer med kända sammansättningar eller annan information som är relevant för utförandet av undersökningen.
- Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning eller finfördelning).

- Testad koncentration/testade koncentrationer.
- Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Motivering för valet av lösningsmedel/vehikel för varje testkemikalie.

Kontroller

Positiv kontroll:

- Kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel och/eller andra identifieringar.
- Fysiskt utseende, log K_{ow} , vattenlöslighet, löslighet i DMSO, molekylvikt och andra relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga och när så är tillämpligt.
- Renhet, kemisk identitet för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.
- Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning eller finfördelning).
- Testad koncentration/testade koncentrationer.
- Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Hänvisning till tidigare resultat för positiv kontroll som visar på lämpliga acceptanskriterier för testomgångar, om detta är tillämpligt.

Negativ kontroll och lösningsmedels-/vehikelkontroll:

- Kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel och/eller andra identifieringar.
- Renhet, kemisk identitet för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.
- Fysiskt utseende, molekylvikt och andra relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper om annat lösningsmedel/annan vehikel för kontroll än de som anges i testriktlinjen används, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Motivering för valet av lösningsmedel/vehikel för varje testkemikalie.

Testbetingelser

- Namn och adress för sponsor, testanläggning och försöksledare.
- Beskrivning av använt test.
- Använd cellinje samt dess lagringsförhållanden och källa (till exempel den anläggning varifrån cellerna erhöles).
- Använd utrustning för flödescytometri (till exempel modell), inklusive använda instrumentinställningar, använt globulin och använda antikroppar och cytotoxicitetsmarkörer.
- Det förfarande som använts för att visa att laboratoriet är kvalificerat att utföra testet, genom test av kvalifikationsämnen, samt det förfarande som använts för att visa att testet kan reproduceras över tid, till exempel historiska kontrolldata och/eller historiska data för reaktivitetskontroller.

Testets acceptanskriterier

- Erhållna värden för cellviabilitet, MFI och RFI med lösningsmedels-/vehikelkontrollen jämfört med de godkända intervallen.
- Erhållna värden för cellviabilitet och RFI med den positiva kontrollen jämfört med de godkända intervallen.
- Cellviabiliteten för alla testade koncentrationer av den testade kemikalien.

Testförfarande

- Antal utförda testomgångar.
- Testkemikaliens koncentrationer, applicering och exponeringstid (vid avvikelser från rekommendationerna).
- Exponeringens längd (vid avvikelser från rekommendationerna).
- Beskrivning av de utvärderings- och beslutskriterier som använts.
- Beskrivning av eventuella modifieringar av testförfarandet.

Resultat

- Tabelluppställning av erhållna data, inklusive CV75 (om detta är tillämpligt), individuella geometriska MFI-, RFI- och cellviabilitetsvärden samt EC150/EC200-värden (om detta är tillämpligt), för testkemikalien och för den positiva kontrollen i varje testomgång, samt en indikering av testkemikaliens klassificering enligt prediktionsmodellen.
- Beskrivning av andra relevanta observationer, i förekommande fall.

Diskussion kring resultaten

- Diskussion kring de resultat som har erhållits med h-CLAT-testet.
- Beaktande av testets resultat inom ramen för en IATA, om annan relevant information finns att tillgå.

Slutsatser

LITTERATUR

- (1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, s. 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, s. 428–437.
- (3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Finns på <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 1150–1160.
- (12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Finns på <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>
- (13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report. Finns på <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, s. 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.* 38, s. 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, s. 1683–1969.
- (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. ATLA 15, s. 81–88.
- (18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), s. 23. Finns på <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. ATLA 13, s. 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, s. 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. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris, Frankrike, 2005, s. 96.
- (22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Finns på [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- (23) Förenta nationerna (FN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS, det globalt harmoniserade systemet för klassificering och märkning av kemikalier). Femte reviderade utgåvan. New York och Genève: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Finns på http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).
- (25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, s. 27–35.

Tillägg 1.1

DEFINITIONER

Noggrannhet: Anger hur väl testresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Det är ett mått på testets prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med ett test (21).

AOP (Adverse Outcome Pathway): Sekvens av händelser, från den kemiska strukturen hos en målkemikalie eller en grupp av liknande kemikalier, genom den molekylära inledande händelsen och fram till ett in vivo-resultat av intresse (22).

Kemikalie: Ett ämne eller en blandning.

CV75: Den uppskattade koncentration som uppvisar 75 % cellviabilitet.

EC150: Koncentrationer som uppvisar RFI-värden på 150 för CD86-uttryck.

EC200: Koncentrationer som uppvisar RFI-värden på 200 för CD54-uttryck.

Flödescytometri: En cytometrisk teknik där celler som är suspenderade i en vätska en i taget flödar genom ett fokuserat exciterande ljus, som sprids i mönster som är kännetecknande för cellerna och deras komponenter; celler märks ofta med fluorescerande markörer, så att ljus först absorberas och sedan emitteras med ändrad frekvens.

Fara: Inneboende egenskap hos ett ämne eller en situation som har potential att orsaka skadliga effekter när en organism, ett system eller en (del-)population exponeras för ämnet.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): En strukturerad strategi som används för identifiering av fara (risk), karakterisering av fara (styrka) och/eller säkerhetsbedömning (risk/styrka och exponering) för en kemikalie eller en grupp av kemikalier, som strategiskt integrerar och väger in alla relevanta data som underlag för tillsynsbeslut om potentiell fara och/eller risk och/eller om behovet av ytterligare riktad och därigenom minimerad testning.

Mediumkontroll: Ett obehandlat replikat som innehåller alla komponenter i ett testsystem. Detta prov hanteras tillsammans med testkemikaliebehandlade prover och andra kontrollprover för att avgöra huruvida lösningsmedlet/vehikeln interagerar med testsystemet.

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

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

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

Positiv kontroll: Ett replikat som innehåller testsystemets alla komponenter och som behandlats med ett ämne som man vet ger en positiv respons. För att säkerställa att variationer i den positiva kontrollens respons över tid kan bedömas, bör den positiva responsen inte vara alltför kraftfull.

Prehaptener: Kemikalier som blir sensibiliserande ämnen genom abiotisk omvandling.

Prohaptener: Kemikalier som kräver enzymatisk aktivering för att deras hudsensibiliserande potential ska aktiveras.

Relativ fluorescensintensitet (RFI): Relativa värden avseende MFI-värdet (det geometriska medelvärdet för fluorescensintensiteten) för kemikaliebehandlade celler jämfört med MFI-värdet för lösningsmedels-/vehikelbehandlade celler.

Relevans: Beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida testet är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur pass väl man genom testet korrekt kan mäta eller prediktera den biologiska effekt det gäller. Relevansen omfattar även överväganden om ett tests noggrannhet (konkordans) (21).

Tillförlitlighet: Mått på i vilken utsträckning ett test kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tid, när det utförs med användning av samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier och repeterbarheten inom laboratorier (21).

Testomgång: En testomgång utgörs av att en eller flera testkemikalier testas parallellt med en lösningsmedels-/vehikelkontroll och en positiv kontroll.

Sensitivitet: Den andel av alla positiva/aktiva kemikalier som klassificeras korrekt av testet. Känsligheten är ett mått på noggrannheten hos ett test som ger kategoriserande resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av ett tests relevans (21).

Infärgningsbuffert: En fosfatbuffrad saltlösning som innehåller 0,1 % bovint serumalbumin.

Lösningsmedels-/vehikelkontroll: Ett obehandlat prov som innehåller alla komponenter i ett testsystem förutom testkemikalien, men med det lösningsmedel/den vehikel som används. Lösningsmedels-/vehikelkontrollen används för att fastställa grundresponsen för de prover som behandlas med testkemikalien som är upplöst eller dispergerad i en stabil dispersion i samma lösningsmedel/vehikel. Vid test med en parallell mediumkontroll, visar

provet också huruvida lösningsmedlet/vehikeln interagerar med testsystemet.

Specificitet: Den andel av alla negativa/inaktiva kemikalier som klassificeras korrekt av testet. Specificiteten är ett mått på noggrannheten hos ett test som ger kategoriserande resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av ett tests relevans (21).

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

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med detta test.

FN:s globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS): Ett system för att klassificera kemikalier (ämnen och blandningar) utifrån standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker och informera om resultaten genom exempelvis piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad, i syfte att informera om kemikaliernas skadliga effekter för att skydda människor (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) och miljön (23).

UVCB-ämnen: Ämnen med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiska material.

Giltigt test: Ett test som anses vara tillräckligt relevant och tillförlitligt för ett särskilt ändamål och som är baserat på vetenskapligt sunda principer. Ett test är aldrig giltigt i absolut bemärkelse, utan endast i förhållande till ett fastställt ändamål (21).

Tillägg 1.2

KVALIFIKATIONSÄMNEN

Innan testet som beskrivs i detta tillägg till testmetod B.71 används rutinmässigt, bör laboratoriet styrka sin tekniska kompetens genom att korrekt erhålla den förväntade h-CLAT-prediktionen för de tio ämnen som rekommenderas i tabell 1 och genom att erhålla CV75-, EC150- och EC200-värden som håller sig inom respektive referensintervall för minst åtta av de tio kvalifikationsämnena. Dessa kvalifikationsämnen har valts ut för att representera hela skalan av responser gällande risker för hudsensibilisering. Övriga urvalskriterier var att ämnena ska vara kommersiellt tillgängliga, att det ska finnas in vivo-referensdata av hög kvalitet och att det ska finnas in vitro-data av hög kvalitet genererade med h-CLAT-testet. Det finns dessutom publicerade referensdata att tillgå för h-CLAT-testet (3) (14).

Tabell 1: Rekommenderade ämnen för att påvisa teknisk kompetens i fråga om h-CLAT-testet

Kvalifikationsämne	CAS-nr	Fysikalisk tillstånd	In vivo- prediktion ¹	CV75, referensinter- vall i µg/ml ²	h-CLAT-resultat för CD86 (EC150- referensintervall i µg/ml) ²	h-CLAT-resultat för CD54 (EC200- referensintervall i µg/ml) ²
2,4-dinitroklorbensen	97-00-7	Fast	Sensibiliserande (extremt)	2–12	Positivt (0,5–10)	Positivt (0,5–15)
4-fenylendiamin	106-50-3	Fast	Sensibiliserande (starkt)	5–95	Positivt (< 40)	Negativt (> 1,5) ³
Nickelsulfat	10101-97-0	Fast	Sensibiliserande (måttligt)	30–500	Positivt (< 100)	Positivt (10–100)
2-mercaptobensotiazol	149-30-4	Fast	Sensibiliserande (måttligt)	30–400	Negativt (> 10) ³	Positivt (10–140)
R(+)-limonen	5989-27-5	Flytande	Sensibiliserande (svagt)	> 20	Negativt (> 5) ³	Positivt (< 250)
Imidazolidinylurea	39236-46-9	Fast	Sensibiliserande (svagt)	25–100	Positivt (20–90)	Positivt (20–75)
Isopropanol	67-63-0	Flytande	Ej sensibiliserande	> 5 000	Negativt (> 5 000)	Negativt (> 5 000)
Glycerol	56-81-5	Flytande	Ej sensibiliserande	> 5 000	Negativt (> 5 000)	Negativt (> 5 000)
Mjölksyra	50-21-5	Flytande	Ej sensibiliserande	1 500–5 000	Negativt (> 5 000)	Negativt (> 5 000)
4-aminobensoesyra	150-13-0	Fast	Ej sensibiliserande	> 1 000	Negativt (> 1 000)	Negativt (> 1 000)

Förkortningar: CAS-nr = nummer i registret som förs av Chemical Abstracts Service.

¹ In vivo-prediktioner gällande fara (och styrka) är baserade på LLNA-data (3) (14). In vivo-styrkan härleds med användning av de kriterier som föreslagits av ECETOC (24).

² Baserat på historiskt observerade värden (13) (25).

³ Historiskt sett har negativa resultat varit i majoritet för denna markör och därför förväntas huvudsakligen ett negativt

resultat. Intervallet som anges har definierats baserat på ett fåtal historiskt observerade positiva resultat. Om ett positivt resultat erhålls ska EC-värdet ligga inom det redovisade referensintervallet.

Tillägg 2

IN VITRO-TEST AVSEENDE HUDSENSIBILISERING: U-SENS™ (AKTIVERINGSTEST FÖR CELLINJEN U937)

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

1. U-SENS™-testet kvantifierar förändringen i uttrycket av en cellytemarkör som är kopplad till aktiveringsprocessen för monocytter och dendritiska celler (det vill säga CD86) hos den humana cellinjen U937 (med ursprung i histiocytiskt lymfom) efter exponering för sensibiliserande ämnen (1). De uppmätta uttrycksnivåerna för cellytemarkören CD86 i cellinjen U937 används sedan för att understödja uppdelningen mellan hudsensibiliserande ämnen och icke-hudsensibiliserande ämnen.
2. U-SENS™-testet har utvärderats i en valideringsstudie (2) samordnad av L'Oreal med efterföljande oberoende kollegial granskning av EURL ECVAM:s rådgivande vetenskapliga kommitté (ESAC) (3). Med beaktande av alla tillgängliga bevis och inkomna åsikter från tillsynsmyndigheter och intressenter, rekommenderades U-SENS™-testet av EURL ECVAM (4) att användas som en del av en IATA för att understödja uppdelningen mellan hudsensibiliserande ämnen och icke-hudsensibiliserande ämnen för faroklassificering och -märkning. I sitt vägledande dokument om redovisning av strukturerade arbetssätt för dataintegrering och individuella informationskällor använda inom ramen för en IATA för hudsensibilisering, diskuterar OECD för närvarande ett antal fallstudier som beskriver olika teststrategier och prediktionsmodeller. Ett av de definierade arbetssätten är baserat på U-SENS™-testet (5). Exempel på användning av data från U-SENS™-test i kombination med annan information, däribland historiska data och befintliga giltiga data gällande människor (6), finns även redovisade på andra ställen i litteraturen (4) (5) (7).
3. U-SENS™-testet har visat sig vara överförbart till laboratorier som har erfarenhet av cellodlingstekniker och flödescytometrisk analys. Testets förväntade reproducerbarhet i fråga om prediktioner är i storleksordningen 90 % inom laboratorier respektive 84 % mellan laboratorier (8). De erhållna resultaten i valideringsstudien (8) och andra publicerade studier (1) visar sammantaget att jämfört med LLNA-resultat är noggrannheten när det gäller att skilja mellan hudsensibiliserande ämnen (det vill säga kategori 1 enligt GHS/CLP-förordningen) och icke-hudsensibiliserande ämnen 86 % (N = 166), med en sensitivitet på 91 % (118/129) och en specificitet på 65 % (24/37). Jämfört med resultat på människa är noggrannheten när det gäller att skilja mellan hudsensibiliserande ämnen (det vill säga kategori 1 enligt GHS/CLP-förordningen) och icke-hudsensibiliserande ämnen 77 % (N = 101) med en sensitivitet på 100 % (58/58) och en specificitet på 47 % (20/43).

Det är mer sannolikt att falska negativa prediktioner med U-SENSTM-testet, jämfört med LLNA-resultat, gäller kemikalier som uppvisar en låg till måttlig hudsensibiliserande styrka (det vill säga underkategori 1B enligt GHS/CLP-förordningen) än kemikalier som uppvisar en hög hudsensibiliserande styrka (det vill säga underkategori 1A enligt GHS/CLP-förordningen) (1) (8) (9). Sammantaget visar informationen att U-SENSTM-testet på ett användbart sätt bidrar till identifieringen av risker för hudsensibilisering. De noggrannhetsvärden som anges här för U-SENSTM-testet som ett fristående test är dock endast vägledande, eftersom testet bör beaktas i kombination med andra informationskällor inom ramen för en IATA och i enlighet med bestämmelserna i punkterna 7 och 8 i Allmän inledning. Vid utvärdering av tester utan djurförsök gällande hudsensibilisering bör man dessutom tänka på att såväl LLNA-testet som andra djurförsök eventuellt inte avspeglar situationen för människor fullt ut.

4. U-SENSTM-testet har, baserat på de uppgifter som finns tillgängliga för närvarande, visat sig vara tillämpligt för testkemikalier (inklusive beståndsdelar i kosmetika, till exempel konserveringsmedel, ytaktiva ämnen, aktiva substanser och färgämnen) som omfattar en rad olika organiska funktionella grupper, fysikalisk-kemiska egenskaper och hudsensibiliseringsstyrkor (vilket har fastställts i in vivo-undersökningar), samt spektrumet av reaktionsmekanismer som är kända för att vara associerade med hudsensibilisering (det vill säga Michaeladdition, Schiff-basbildning, acylering, bimolekylär nukleofil substitution [SN₂] eller nukleofil aromatisk substitution [S_NAr]) (1) (8) (9) (10). U-SENSTM-testet är tillämpligt för testkemikalier som är lösliga eller som bildar en stabil dispersion (det vill säga en kolloid eller en suspension i vilken testkemikalien inte sjunker till botten eller separeras från lösningsmedlet/vehikeln till olika faser) i ett lämpligt lösningsmedel/en lämplig vehikel (se punkt 13). Kemikalier i datamängden som rapporteras vara prehaptener (det vill säga ämnen som aktiveras genom oxidation) eller prohaptener (det vill säga ämnen som kräver enzymatisk aktivering, till exempel via P450-enzymen) har kunnat predikteras korrekt med U-SENSTM-testet (1) (10). Membranförstörande ämnen kan leda till falska positiva resultat till följd av en icke-specifik ökning av CD86-uttrycket, vilket visas av att tre av sju falska positiva svar i förhållande till in vivo-referensklassificeringen var ytaktiva ämnen (1). Av den anledningen bör positiva resultat med ytaktiva ämnen betraktas med försiktighet, medan negativa resultat med ytaktiva ämnen fortfarande kan användas som stöd för identifieringen av testkemikalien som ett icke-sensibiliserande ämne. Fluorescerande testkemikalier kan bedömas med U-SENSTM-testet (1), men det bör noteras att kraftigt fluorescerande testkemikalier som sänder ut ljus med samma våglängd som fluoresceinisotiocyanat (FITC) eller propidiumjodid (PI) kommer att störa den flödescytometriska detekteringen och därför inte kan bedömas korrekt med användning av FITC-konjugerade antikroppar (potential för falska negativa resultat) eller PI (viabiliteten är inte mätbar). I sådana fall kan andra fluorokrommärkta antikroppar respektive andra markörer för cytotoxicitet användas, så länge det kan visas att de ger liknande resultat som

FITC-märkta antikroppar eller PI (se punkt 18), till exempel genom test av kvalifikationsämnena i tillägg 2.2. Mot bakgrund av det ovanstående bör positiva resultat med ytaktiva ämnen och negativa resultat med kraftigt fluorescerande testkemikalier tolkas utifrån de fastställda begränsningarna och tillsammans med andra informationskällor, inom ramen för en IATA. Om det finns bevis för att U-SENSTM-testet inte är tillämpligt för andra specifika kategorier av testkemikalier, bör det inte användas för dessa specifika kategorier.

5. Som beskrivs ovan kan U-SENSTM-testet användas för att understödja uppdelningen mellan hudsensibiliserande ämnen och icke-hudsensibiliserande ämnen. Eventuellt kan testet även bidra till bedömningen av sensibiliseringens styrka när det används i integrerade arbetssätt, exempelvis en IATA. Det krävs dock ytterligare arbete, företrädesvis baserat på data gällande människor, för att avgöra hur U-SENSTM-resultat skulle kunna ligga till grund för en bedömning av sensibiliseringens styrka.
6. Definitioner av begrepp finns i tillägg 2.1.

TESTETS PRINCIP

7. U-SENSTM-testet är ett in vitro-test som kvantifierar förändringar i uttrycket av CD86-cellytemarkör hos celler från den humana cellinjen U937 (med ursprung i histiocytiskt lymfom), efter 45 ± 3 timmars exponering för testkemikalien. CD86-cellytemarkören är en typisk markör för U937-aktivering. Det är allmänt känt att CD86 är en samstimulerande molekyll som kan efterlikna monocytisk aktivering, som spelar en avgörande roll vid priming av T-celler. Förändringarna i uttrycket av CD86-cellytemarkören mäts genom flödescytometri efter infärgning av cellerna, normalt med FITC-märkta antikroppar. Mätningar av cytotoxiciteten utförs också parallellt (till exempel med användning av PI) för att bedöma huruvida uppregleringar av uttrycket av CD86-cellytemarkören förekommer vid subcytotoxiska koncentrationer. Stimulationsindexet (SI) för CD86-cellytemarkören jämfört med lösningsmedels-/vehikelkontrollen beräknas och används i prediktionsmodellen (se punkt 19) för att understödja uppdelningen mellan hudsensibiliserande ämnen och icke-hudsensibiliserande ämnen.

DEMONSTRATION AV KOMPETENS

8. Innan testet som beskrivs i detta tillägg till testmetod B.71 används rutinmässigt, bör laboratoriet styrka sin tekniska kompetens med användning av de tio kvalifikationsämnena som anges i tillägg 2.2, i enlighet med god praxis för in vitro-metoder (11). Dessutom bör användare av testet föra en historisk databas över data som erhålls genom reaktivitetskontrollerna (se punkt 11) och genom de positiva kontrollerna och

lösningsmedels-/vehikelkontrollerna (se punkterna 15–16) och använda dessa data för att styrka att testets reproducerbarhet bibehålls i laboratoriet över tid.

FÖRFARANDE

9. Det här testet är baserat på U-SENSTM DB-ALM-protokoll (DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation) nr 183 (12). Standardförfaranden (SOP, Standard Operating Procedures) bör användas när U-SENSTM-testet införs och används i laboratoriet. Ett automatiserat system för genomförande av U-SENSTM-testet kan användas om det kan styrkas att det ger liknande resultat, till exempel genom test av kvalifikationsämnena i tillägg 2.2. Nedan följer en beskrivning av de viktigaste delarna i och förfarandena för U-SENSTM-testet.

Förberedelse av celler

10. Den humana cellinjen U937 (med ursprung i histiocytiskt lymfom) (13) ska användas vid utförandet av U-SENSTM-testet. Celler (av klon CRL1593.2) bör erhållas från en välmeriterad cellbank, exempelvis American Type Culture Collection.
11. U937-celler odlas, vid 37 °C i en fuktad atmosfär med 5 % CO₂, i RPMI-1640-medium som har kompletterats med 10 % fetalt kalvserum (FCS), 2 mM L-glutamin, 100 enheter/ml penicillin och 100 µg/ml streptomycin (nedan kallat *komplett medium*). U937-celler ska regelbundet genomgå cellpassage, varannan till var tredje dag, med en densitet på 1,5 respektive 3×10^5 celler/ml. Celldensiteten bör inte överstiga 2×10^6 celler/ml och cellviabiliteten, uppmätt genom infärgning av döda celler med trypanblått, bör vara ≥ 90 % (gäller inte vid den första cellpassagen efter upptining). Innan de används för testning bör varje sats med celler, FCS eller antikroppar genomgå en kvalificering i form av en reaktivitetskontroll. Reaktivitetskontrollen av cellerna bör utföras med användning av den positiva kontrollen trinitrobensensulfonsyra (2,4,6-trinitrobensensulfonsyra: TNBS) (CAS-nr 2508-19-2, ≥ 99 % renhet) och den negativa kontrollen mjölksyra (CAS-nr 50-21-5, ≥ 85 % renhet), när det har gått åtminstone en vecka efter upptining. För reaktivitetskontrollen bör sex slutliga koncentrationer testas för var och en av de båda kontrollerna (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75 och 100 µg/ml och mjölksyra: 1, 10, 20, 50, 100 och 200 µg/ml). TNBS löst i komplett medium bör ge en positiv och koncentrationsrelaterad respons för CD86 (till exempel när en positiv koncentration, CD86 SI ≥ 150 , följs av en koncentration med ett högre CD86 SI-värde) och mjölksyra löst i komplett medium bör ge en negativ respons för CD86 (se punkt 21). Endast sådana satser med celler som har klarat reaktivitetskontrollen två gånger ska användas för testet. Celler kan förökas upp till sju veckor efter upptining. Antalet passager bör inte överstiga 21. Reaktivitetskontrollen bör utföras i enlighet med de förfaranden som beskrivs i punkterna 18–22.

12. För testet sås U937-celler ut med en densitet på antingen 3×10^5 celler/ml eller 6×10^5 celler/ml, varefter de förödlas i odlingsflaskor under två dygn respektive ett dygn. Andra förödlingsförhållanden än de som beskrivs ovan kan användas om en tillfredsställande vetenskaplig motivering tillhandahålls och om det kan styrkas att liknande resultat uppnås, till exempel genom test av kvalifikationsämnena i tillägg 2.2. På testdagen resuspenderas de skördade cellerna från odlingsflaskorna med nytt odlingsmedium, så att en koncentration på 5×10^5 celler/ml erhålls. Därefter fördelas cellerna i en flatbottnad 96-hålsplatta med 100 µl per brunn (vilket ger en slutlig celldensitet på $0,5 \times 10^5$ celler/brunn).

Beredning av testkemikalier och kontrollämnena

13. Lösligheten bedöms före testet. För detta ändamål löses testkemikalierna upp eller dispergeras i en stabil dispersion, med koncentrationen 50 mg/ml, i komplett medium som primärt lösningsmedelsalternativ eller dimetylsulfoxid (DMSO, $\geq 99\%$ renhet) som sekundärt lösningsmedels-/vehikelalternativ om testkemikalien inte är lös i lösningsmedlet/vehikeln i komplett medium. För själva testet löses testkemikalien till en slutlig koncentration på 0,4 mg/ml i komplett medium, om kemikalien är lös i detta lösningsmedel/denna vehikel. Om kemikalien endast är lös i DMSO, löses kemikalien till en koncentration på 50 mg/ml. Andra lösningsmedel/vehiklar än de som beskrivs ovan kan användas om en tillfredsställande vetenskaplig motivering tillhandahålls. Testkemikaliens stabilitet i det slutliga lösningsmedlet/den slutliga vehikeln ska tas i beaktande.
14. Testkemikalierna och kontrollämnena bereds på testdagen. Eftersom något dosfinnande test inte genomförs bör, för den första testomgången, sex slutliga koncentrationer testas (1, 10, 20, 50, 100 och 200 µg/ml), utspädda i motsvarande lösningsmedel/vehikel, antingen komplett medium eller 0,4 % DMSO i medium. För de efterföljande testomgångarna ska minst fyra arbetslösningar (det vill säga minst fyra koncentrationer), med start från en testkemikalielösning på 0,4 mg/ml i komplett medium eller 50 mg/ml i DMSO, beredas med användning av motsvarande lösningsmedel/vehikel. Arbetslösningarna används slutligen för behandlingen genom att en lika stor volym U937-cellsuspension (se punkt 11 ovan) som volymen arbetslösning tillsätts till plattan, vilket ger en ytterligare tvåfaldig spädning (12). Koncentrationerna (minst fyra koncentrationer) för eventuella ytterligare testomgångar väljs baserat på de enskilda resultaten från alla tidigare testomgångar (8). De användbara slutliga koncentrationerna är 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 och 200 µg/ml. Den maximala slutliga koncentrationen är 200 µg/ml. Om ett CD86-positivt värde observeras vid 1 µg/ml ska man göra ett test vid 0,1 µg/ml för att hitta den koncentration av testkemikalien som inte ger upphov till en CD86-respons över gränsen för positivt resultat. För varje testomgång

beräknas EC150-värdet (den koncentration vid vilken en kemikalie uppnår det CD86-positiva gränsvärdet 150 %, se punkt 19), om en CD86-positiv koncentrationsrespons observeras. Om testkemikalien ger upphov till en positiv CD86-respons som inte är koncentrationsrelaterad är det eventuellt inte relevant att beräkna EC150-värdet, enligt beskrivningen i U-SENS™ DB-ALM-protokoll nr 183 (12). För varje testomgång beräknas CV70-värdet (den koncentration vid vilken en kemikalie uppnår cytotoxicitetsgränsvärdet på 70 %, se punkt 19), om detta är möjligt (12). För att undersöka den koncentrationsrelaterade responsen vid ökat CD86-värde, bör valfria koncentrationer bland de användbara koncentrationerna väljas ut, jämnt spridda mellan EC150 (eller den högsta CD86-negativa icke-cytotoxiska koncentrationen) och CV70 (eller den högsta tillåtna koncentrationen, det vill säga 200 µg/ml). Minst fyra koncentrationer bör testas per testomgång, där åtminstone två koncentrationer är gemensamma med den föregående testomgången/de föregående testomgångarna, för jämförelse.

15. Lösningsmedels-/vehikelkontrollen som används i U-SENS™-testet utgörs av komplett medium (för testkemikalier som är upplösta eller dispergerade i en stabil dispersion) (se punkt 4) eller 0,4 % DMSO i komplett medium (för testkemikalier som är upplösta eller dispergerade i en stabil dispersion i DMSO).
16. Den positiva kontrollen som används i U-SENS™-testet utgörs av TNBS (se punkt 11), som har beretts i komplett medium. TNBS bör användas som positiv kontroll för mätning av CD86-uttryck i en enda slutlig koncentration i plattan (50 µg/ml) som ger > 70 % cellviabilitet. För att uppnå en koncentration på 50 µg/ml TNBS i plattan bereds en 1 M (det vill säga 293 mg/ml) stamlösning av TNBS i komplett medium, som sedan späds vidare 2 930-faldigt med komplett medium till en arbetslösning på 100 µg/ml. Mjölksyra (CAS-nr 50-21-5) bör användas som negativ kontroll med koncentrationen 200 µg/ml löst i komplett medium (från en stamlösning på 0,4 mg/ml). I varje platta för varje testomgång bereds tre replikat med obehandlad kontroll (komplett medium), Lösingsmedels-/vehikelkontroll, negativ kontroll och positiv kontroll (12). Andra lämpliga positiva kontroller kan användas om historiska data finns att tillgå för att härleda jämförbara acceptanskriterier. Acceptanskriterierna är desamma som de som beskrivs för testkemikalien (se punkt 12).

Applicering av testkemikalier och kontrollämnen

17. Lösningsmedels-/vehikelkontrollen eller arbetslösningarna som beskrivs i punkterna 14–16 blandas 1:1 (volymförhållande) med de cellsuspensioner som beretts i den flatbottnade 96-hålsplattan (se punkt 12). De behandlade plattorna inkuberas därefter i 45 ± 3 timmar vid 37 °C i en atmosfär med 5 % CO₂. Innan inkuberingen förseglas plattorna med semipermeabla membran, för att förhindra avdunstning av flyktiga testkemikalier och korskontaminering mellan celler behandlade med testkemikalier (12).

Cellinfärgning

18. Efter 45 ± 3 timmars exponering överförs cellerna till en mikrotiterplatta med brunnar med V-formad botten och samlas upp genom centrifugering. Störd löslighet definieras som kristaller eller droppar som kan observeras under mikroskop 45 ± 3 timmar efter behandling (innan cellinfärgningen). Supernatanterna kasseras och de kvarvarande cellerna tvättas en gång med 100 μ l iskall fosfatbuffrad saltlösning (PBS, Phosphate Buffered Saline) som innehåller 5 % fetalt kalvserum (infärgningsbuffert). Efter centrifugeringen resuspenderas cellerna med 100 μ l infärgningsbuffert och färgas med 5 μ l (till exempel 0,25 μ g) FITC-märkta antikroppar av typ anti-CD86 eller IgG1 från mus (isotyp) vid 4 °C under 30 minuter, skyddat från ljus. De antikroppar som beskrivs i U-SENS™ DB-ALM-protokoll nr 183 (12) ska användas (för CD86: BD-PharMingen nr 555657, klon: Fun-1, eller Caltag/Invitrogen nr MHCD8601, klon: BU63; och för IgG1: BD-PharMingen nr 555748 eller Caltag/Invitrogen nr GM4992). Enligt testutvecklarnas erfarenhet är fluorescensintensiteten hos antikropparna vanligtvis likartad mellan olika satser. Antikroppar av andra kloner eller från andra leverantörer som har klarat reaktivitetskontrollen får användas för testet (se punkt 11). Användarna kan dock överväga att titrera antikropparna under de egna laboratorieförhållandena för att få fram den bästa användningskoncentrationen. Andra detekteringssystem, som fluorokrommärkta antikroppar av typ anti-CD86, kan användas om det kan visas att de ger liknande resultat som FITC-konjugerade antikroppar, till exempel genom av test av kvalifikationsämnen i tillägg 2.2. Efter två tvättar med 100 μ l infärgningsbuffert och en tvätt med 100 μ l iskall PBS resuspenderas cellerna i iskall PBS (till exempel 125 μ l för prover som ska analyseras manuellt rör för rör eller 50 μ l vid användning av en autosampler-platta) och PI-lösning tillsätts (med en slutlig koncentration på 3 μ g/ml). Andra cytotoxicitetsmarkörer, som 7-aminoaktinomycin D (7-AAD) eller trypanblått, kan användas om det kan visas att den alternativa infärgningen ger liknande resultat som PI, till exempel genom test av kvalifikationsämnen i tillägg 2.2.

Analys genom flödescytometri

19. Uttrycksnivån för CD86 och cellviabiliteten analyseras med hjälp av flödescytometri. Cellerna visas i ett punktdiagram med logaritmisk skala utifrån storlek (FSC) och granularitet (SSC), i syfte att tydligt identifiera populationen inom en första avgränsning R1 och eliminera skräp från döda celler. Ett målanttal på 10 000 celler inom avgränsning R1 mäts för varje brunn. Celler från samma R1-avgränsning visas i ett FL3 eller FL4/SSC-punktdiagram. Viabla celler avskiljs genom en andra avgränsning R2, som väljer ut populationen av propidiumjodid-negativa celler (kanal FL3 eller FL4). Cellviabiliteten kan beräknas av cytometriundersökningens analysprogram med användning av nedanstående formel. Om cellviabiliteten är låg bör upp till 20 000 celler, inklusive döda celler, mätas. Alternativt kan data samlas in under en minut från det att analysen påbörjas.

$$\text{Cellviabilitet} = \frac{\text{Antal levande celler}}{\text{Totalt antal registrerade celler}} \times 100$$

Procentandelen FL1-positiva celler mäts sedan bland dessa viabla celler som avgränsats genom R2 (inom R1). Cellytornas uttryck av CD86 analyseras i ett FL1/SSC-punktdiagram som avgränsats till viabla celler (R2).

För brunnarna med komplett medium/IgG1 sätts analysmarkören nära huvudpopulationen, så att kontrollerna för komplett medium har IgG1 inom målzonen 0,6 % till 0,9 %.

Färginterferens definieras som en skiftning hos punktdiagrammet för FITC-märkt IgG1 (SI [geometriskt medelvärde] för IgG1 FL1 ≥ 150 %)

Stimulationsindexet (SI) för CD86 för kontrollceller (obehandlade eller i 0,4 % DMSO) och kemikaliebehandlade celler beräknas enligt följande formel:

$$S.I. = \frac{\% \text{CD86}^+ \text{ behandlade celler} - \% \text{IgG1}^+ \text{ behandlade celler}}{\% \text{CD86}^+ \text{ kontrollceller} - \% \text{IgG1}^+ \text{ kontrollceller}} \times 100$$

% IgG1⁺ obehandlade kontrollceller: avser procentandelen FL1-positiva IgG1-celler som definierats med analysmarkören (godkänt intervall $\geq 0,6$ % och $< 1,5$ %, se punkt 22) bland de viabla obehandlade cellerna.

% IgG1⁺/CD86⁺ kontrollceller/behandlade celler: avser procentandelen FL1-positiva IgG1/CD86-celler uppmätta utan förflyttning av analysmarkören bland de viabla kontrollcellerna/behandlade cellerna.

DATA OCH RAPPORTERING

Utvärdering av data

20. Följande parametrar beräknas i U-SENSTM-testet: CV70-värdet, det vill säga den koncentration som uppvisar 70 % överlevnad hos U937-cellerna (30 % cytotoxicitet), och EC150-värdet, det vill säga den koncentration vid vilken testkemikalierna ger upphov till ett CD86-stimulationsindex (SI) på 150 %.

CV70-värdet beräknas genom log-linjär interpolering med användning av följande formel:

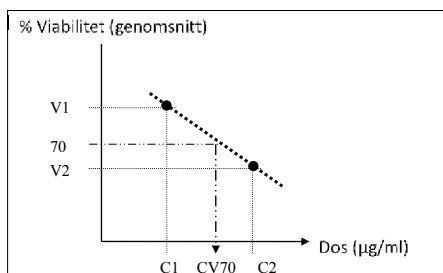
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) \times (C2 - C1)]$$

där

V1 är minimivärdet för en cellviabilitet över 70 %,

V2 är maximivärdet för en cellviabilitet under 70 %,

C1 och C2 är koncentrationerna som ger upphov till cellviabilitetsvärdena V1 respektive V2.



Andra metoder för att få fram CV70-värdet kan användas så länge det kan visas att detta inte har någon inverkan på resultaten (till exempel genom test av kvalifikationsämnena).

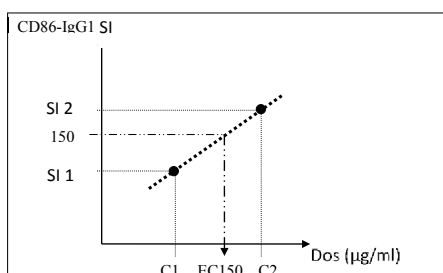
EC150-värdet beräknas genom log-linjär interpolering med användning av följande formel:

$$EC150 = C1 + [(150 - SI\ 1) / (SI\ 2 - SI\ 1) \times (C2 - C1)]$$

där

C1 är den högsta koncentrationen i µg/ml med ett CD86 SI-värde < 150 % (SI 1),

C2 är den lägsta koncentrationen i µg/ml med ett CD86 SI-värde ≥ 150 % (SI 2).



EC150- och CV70-värdena beräknas enligt följande:

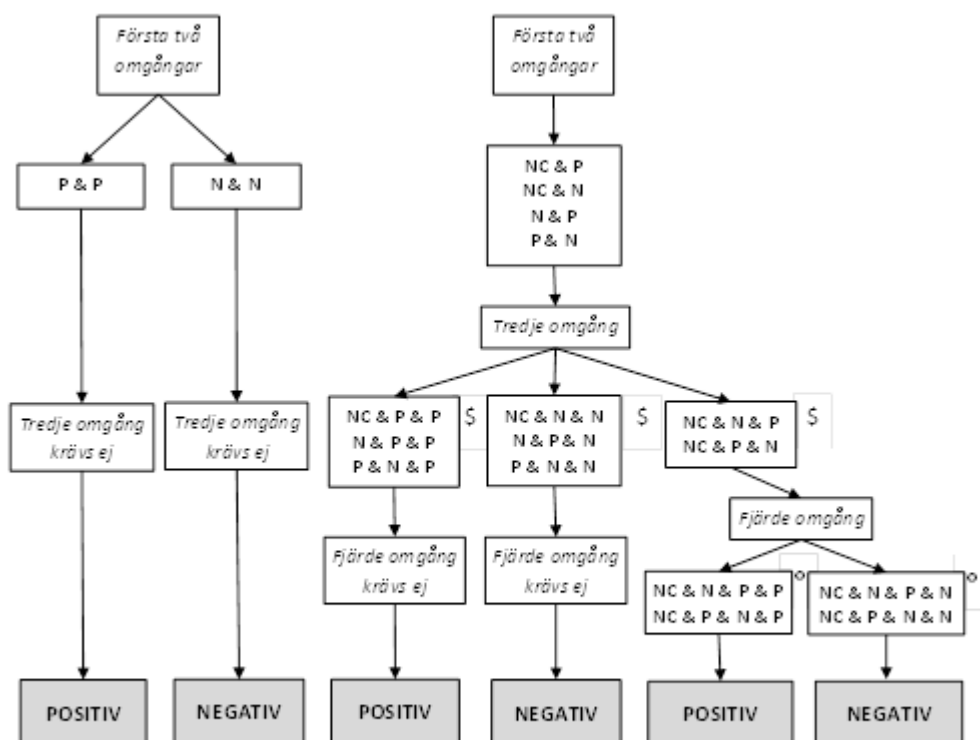
- För varje enskild testomgång: De enskilda EC150- och CV70-värdena används som verktyg för att undersöka den koncentrationsrelaterade responsen vid ökat CD86-värde (se punkt 14).
- Det övergripande CV70-värdet fastställs baserat på de genomsnittliga viabiliteterna (12).
- Det övergripande EC150-värdet fastställs för en testkemikalie som predikterats som POSITIV med U-SENS™-testet baserat på genomsnittligt SI för CD86 (se punkt 21) (12).

Prediktionsmodell

21. För mätningen av CD86-uttryck testas varje testkemikalie i minst fyra koncentrationer och i minst två oberoende testomgångar (som utförs på olika dagar) för att få fram en enda prediktion (NEGATIV eller POSITIV).

- Det enskilda resultatet för en U-SENSTM-testomgång anses vara negativt (nedan kallat *N*) om SI-värdet för CD86 är lägre än 150 % vid alla icke-cytotoxiska koncentrationer (cellviabilitet ≥ 70 %) och om ingen interferens observeras (cytotoxicitet, löslighet: se punkt 18 eller färg: se punkt 19, oberoende av de icke-cytotoxiska koncentrationer vid vilka interferensen detekteras). I alla övriga fall: när SI-värdet för CD86 är högre än eller lika med 150 % och/eller interferens observeras, anses det enskilda resultatet för en U-SENSTM-testomgång vara positivt (nedan kallat *P*).
- En U-SENSTM-prediktion anses vara NEGATIV om åtminstone två oberoende testomgångar är negativa (*N*) (se figur 1). Om de första två testomgångarna båda är negativa (*N*) anses U-SENSTM-prediktionen vara NEGATIV och någon tredje testomgång behöver inte utföras.
- En U-SENSTM-prediktion anses vara POSITIV om åtminstone två oberoende testomgångar är positiva (*P*) (se figur 1). Om de första två testomgångarna båda är positiva (*P*) anses U-SENSTM-prediktionen vara POSITIV och någon tredje testomgång behöver inte utföras.
- Eftersom något dosfinnande test inte utförs gäller ett undantag om SI-värdet för CD86 i den första testomgången är högre än eller lika med 150 % enbart vid den högsta icke-cytotoxiska koncentrationen. Testomgången anses då vara EJ AVGÖRANDE (*NC*, NOT CONCLUSIVE) och ytterligare koncentrationer (mellan den högsta icke-cytotoxiska koncentrationen och den lägsta cytotoxiska koncentrationen – se punkt 20) bör testas i ytterligare testomgångar. Om en testomgång identifieras som *NC* ska åtminstone två ytterligare testomgångar genomföras, samt en fjärde testomgång om testomgångarna 2 och 3 inte är samstämmiga (den ena är *N* och den andra är *P*) (se figur 1). Uppföljande testomgångar anses positiva även om endast en icke-cytotoxisk koncentration ger ett CD86-värde som är lika med eller högre än 150 %, eftersom koncentrationsvärdena har justerats för den specifika testkemikalien. Den slutliga prediktionen ska baseras på majoritetsresultatet för de tre eller fyra enskilda testomgångarna (det vill säga två av tre eller två av fyra) (se figur 1).

Figur 1: Prediktionsmodell som används för U-SENSTM-testet. En U-SENSTM-prediktion bör beaktas inom ramen för en IATA och i enlighet med bestämmelserna i punkt 4 samt punkterna 7, 8 och 9 i Allmän inledning.



N:

Testomgång utan positivt CD86-resultat och utan observerad interferens.

P: Testomgång med positivt CD86-resultat och/eller observerad interferens.

NC: Ej avgörande. Den första testomgången räknas som Ej avgörande när CD86-resultatet endast är positivt vid den högsta icke-cytotoxiska koncentrationen.

#: Ett NC-resultat (ej avgörande), vilket endast är aktuellt för den första testomgången, medför automatiskt att det krävs en tredje testomgång för att uppnå en majoritet positiva (P) eller negativa (N) resultat, det vill säga samma resultat för minst två av tre oberoende testomgångar.

\$: Rutorna visar de relevanta kombinationerna av resultat från de tre testomgångarna, baserat på resultaten från de första två testomgångarna i rutan ovanför.

°: Rutorna visar de relevanta kombinationerna av resultat från de fyra testomgångarna, baserat på resultaten från de första tre testomgångarna i rutan ovanför.

Acceptanskriterier

22. Följande acceptanskriterier ska vara uppfyllda vid användning av U-SENSTM-testet (12):

- I slutet av exponeringsperioden på 45 ± 3 timmar måste den genomsnittliga viabiliteten för de tre replikaten med obehandlade U937-celler vara $> 90 \%$ och ingen drift av CD86-uttrycket får observeras. Det grundläggande CD86-uttrycket för obehandlade U937-celler måste ligga inom intervallet $\geq 2 \%$ och $\leq 25 \%$.

- När DMSO används som lösningsmedel bedöms giltigheten för DMSO-vehikelkontrollen genom beräkning av ett DMSO SI-värde som jämförs med motsvarande värde för obehandlade celler, och den genomsnittliga viabiliteten för de tre replikaten med celler måste vara $> 90 \%$. DMSO-vehikelkontrollen är giltig om genomsnittet för de tre replikatens CD86 SI-värden är mindre än 250% av genomsnittet för CD86 SI-värdena för de tre replikaten med obehandlade U937-celler.
- Testomgångarna anses giltiga om åtminstone två av tre IgG1-värden för obehandlade U937-celler hamnar inom intervallet $\geq 0,6 \%$ och $< 1,5 \%$.
- Den parallellt testade negativa kontrollen (mjölksyra) anses giltig om åtminstone två av de tre replikaten är negativa (CD86 SI $< 150 \%$) och icke-cytotoxiska (cellviabilitet $\geq 70 \%$).
- Den positiva kontrollen (TNBS) anses giltig om åtminstone två av de tre replikaten är positiva (CD86 SI $\geq 150 \%$) och icke-cytotoxiska (cellviabilitet $\geq 70 \%$).

Testrapport

23. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie

Monokomponentämne:

- Kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel och/eller andra identifieringar.
- Fysiskt utseende, löslighet i komplett medium, löslighet i DMSO, molekylvikt och andra relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Renhet, kemisk identitet för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.
- Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning eller finfördelning).
- Testad koncentration/testade koncentrationer.
- Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Motivering för valet av lösningsmedel/vehikel för varje testkemikalie.

Multikomponentämne, UVCB och blandning:

- Karakteriseras så långt det är möjligt genom exempelvis kemisk identitet (se ovan), renhet, kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper (se ovan) hos beståndsdelarna, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

- Fysiskt utseende, löslighet i komplett medium, löslighet i DMSO och andra relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Molekylvikt eller uppskattad molekylvikt för blandningar/polymerer med kända sammansättningar eller annan information som är relevant för utförandet av undersökningen.
- Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning eller finfördelning).
- Testad koncentration/testade koncentrationer.
- Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Motivering för valet av lösningsmedel/vehikel för varje testkemikalie.

Kontroller

Positiv kontroll:

- Kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel och/eller andra identifieringar.
- Fysiskt utseende, löslighet i DMSO, molekylvikt och andra relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga och när så är tillämpligt.
- Renhet, kemisk identitet för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.
- Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning eller finfördelning).
- Testad koncentration/testade koncentrationer.
- Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Hänvisning till tidigare resultat för positiv kontroll som visar på lämpliga acceptanskriterier för testomgångar, om detta är tillämpligt.

Negativ kontroll och lösningsmedels-/vehikelkontroll:

- Kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel och/eller andra identifieringar.
- Renhet, kemisk identitet för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.

- Fysiskt utseende, molekylvikt och andra relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper om annat lösningsmedel/annan vehikel för kontroll än de som anges i testriktlinjen används, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Motivering för valet av lösningsmedel/vehikel för varje testkemikalie.

Testbetingelser

- Namn och adress för sponsor, testanläggning och försöksledare.
- Beskrivning av testet som använts.
- Använd cellinje samt dess lagringsförhållanden och källa (till exempel den anläggning varifrån cellerna erhöles).
- Använd flödescytometri (till exempel modell), inklusive använda instrumentinställningar, antikroppar och cytotoxicitetsmarkörer.
- Det förfarande som använts för att visa att laboratoriet är kvalificerat att utföra testet, genom test av kvalifikationsämnen, samt det förfarande som använts för att visa att testet kan reproduceras över tid, till exempel historiska kontrolldata och/eller historiska data för reaktivitetskontroller.

Testets acceptanskriterier

- Erhållna värden för cellviabilitet och CD86 SI med lösningsmedels-/vehikelkontrollen jämfört med de godkända intervallen.
- Erhållna värden för cellviabilitet och SI med den positiva kontrollen jämfört med de godkända intervallen.
- Cellviabiliteten för alla testade koncentrationer av den testade kemikalien.

Testförfarande

- Antal utförda testomgångar.
- Testkemikaliens koncentrationer, applicering och exponeringstid (vid avvikelser från rekommendationerna).
- Exponeringstid.
- Beskrivning av de utvärderings- och beslutskriterier som använts.
- Beskrivning av eventuella modifieringar av testförfarandet.

Resultat

- Tabelluppställning av erhållna data, inklusive CV70 (om detta är tillämpligt), SI, cellviabilitetsvärden och EC150-värden (om detta är tillämpligt), för testkemikalien och för den positiva kontrollen i varje testomgång, samt en indikering av testkemikaliens klassificering enligt prediktionsmodellen.
- Beskrivning av andra relevanta observationer, i förekommande fall.

Diskussion kring resultaten

- Diskussion kring de resultat som har erhållits med U-SENSTM-testet.
- Beaktande av testets resultat inom ramen för en IATA, om annan relevant information finns att tillgå.

Slutsatser

LITTERATUR

- (1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, s. 901–916.
- (2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Finns på http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations.
- (3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28178 EN; doi 10.2787/815737. Finns på [<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705>].
- (4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28553 EN; doi 10.2760/588955. Finns på <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/euro-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>.
- (5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, s. 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. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris. Finns på <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris. Finns på http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.
- (12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENSTM), s. 33. Finns på <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>.
- (13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, s. 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. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris. Finns på <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (15) Förenta nationerna (FN) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS, det globalt harmoniserade systemet för klassificering och märkning av kemikalier). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, sjätte reviderade utgåvan, New York och Genève: United Nations Publications. Finns på http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris. Finns på <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.

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

Tillägg 2.1

DEFINITIONER

Noggrannhet: Anger hur väl testresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Det är ett mått på testets prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med ett test (14).

AOP (Adverse Outcome Pathway): Sekvens av händelser, från den kemiska strukturen hos en målkemikalie eller en grupp av liknande kemikalier, genom den molekylära inledande händelsen och fram till ett in vivo-resultat av intresse (15).

Koncentrationsrelaterad respons för CD86: Det råder ett koncentrationsberoende (eller en koncentrationsrelaterad respons) när en positiv koncentration ($CD86\ SI \geq 150$) följs av en koncentration med ett ökande CD86 SI-värde.

Kemikalie: Ett ämne eller en blandning.

CV70: Den uppskattade koncentration som uppvisar 70 % cellviabilitet.

Drift: Definitionen av drift är att i) det korrigerade % $CD86^+$ -värdet för det obehandlade kontrollrepliketet med nr 3 är mindre än 50 % av genomsnittet för de korrigerade % $CD86^+$ -värdena för de obehandlade kontrollreplikaten med nr 1 och 2, och ii) det korrigerade % $CD86^+$ -värdet för det negativa kontrollrepliketet med nr 3 är mindre än 50 % av genomsnittet för de korrigerade % $CD86^+$ -värdena för de negativa kontrollreplikaten med nr 1 och 2.

EC150: De uppskattade koncentrationer som uppvisar ett SI-värde på 150 % för CD86-uttryck.

Flödescytometri: En cytometrisk teknik där celler som är suspenderade i en vätska en i taget flödar genom ett fokuserat exciterande ljus, som sprids i mönster som är kännetecknande för cellerna och deras komponenter; celler märks ofta med fluorescerande markörer, så att ljus först absorberas och sedan emitteras med ändrad frekvens.

Fara: Inneboende egenskap hos ett ämne eller en situation som har potential att orsaka skadliga effekter när en organism, ett system eller en (del-)population exponeras för ämnet.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): En strukturerad strategi som används för identifiering av fara (risk), karakterisering av fara (styrka) och/eller säkerhetsbedömning (risk/styrka och exponering) för en kemikalie eller en grupp av kemikalier, som strategiskt integrerar och väger in alla relevanta data som underlag för tillsynsbeslut om potentiell fara och/eller risk och/eller om behovet av ytterligare riktad och därigenom minimerad testning.

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

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

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

Positiv kontroll: Ett replikat som innehåller testsystemets alla komponenter och som behandlats med ett ämne som man vet ger en positiv respons. För att säkerställa att variationer i den positiva kontrollens respons över tid kan bedömas, bör den positiva responsen inte vara alltför kraftfull.

Prehaptener: Kemikalier som blir sensibiliserande ämnen genom abiotisk omvandling, till exempel genom oxidering.

Prohaptener: Kemikalier som kräver enzymatisk aktivering för att deras hudsensibiliserande potential ska aktiveras.

Relevans: Beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida det är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur pass väl man genom testet korrekt kan mäta eller prediktera den biologiska effekt det gäller. Relevansen omfattar även överväganden om ett tests noggrannhet (konkordans) (14).

Tillförlitlighet: Mått på i vilken utsträckning ett test kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tid, när det utförs med användning av samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier och repeterbarheten inom laboratorier (14).

Testomgång: En testomgång utgörs av att en eller flera testkemikalier testas parallellt med en lösningsmedels-/vehikelkontroll och en positiv kontroll.

Sensitivitet: Den andel av alla positiva/aktiva kemikalier som klassificeras korrekt av testet. Känsligheten är ett mått på noggrannheten hos ett test som ger kategoriserande resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av ett tests relevans (14).

SI: Stimulationsindex. Relativa värden avseende MFI-värdet (det geometriska medelvärdet för fluorescensintensiteten) för kemikaliebehandlade celler jämfört med MFI-värdet för lösningsmedels-/vehikelbehandlade celler.

Lösningsmedels-/vehikelkontroll: Ett obehandlat prov som innehåller alla komponenter i ett testsystem förutom testkemikalien, men med det lösningsmedel/den vehikel som

används. Lösningsmedels-/vehikelkontrollen används för att fastställa grundresponsen för de prover som behandlas med testkemikalien som är upplöst eller dispergerad i en stabil dispersion i samma lösningsmedel/vehikel. Vid test med en parallell mediumkontroll, visar provet också huruvida lösningsmedlet/vehikeln interagerar med testsystemet.

Specificitet: Den andel av alla negativa/inaktiva kemikalier som klassificeras korrekt av testet. Specificiteten är ett mått på noggrannheten hos ett test som ger kategoriserande resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av ett tests relevans (14).

Infärgningsbuffert: En fosfatbuffrad saltlösning som innehåller 5 % fetalt kalvserum.

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

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med detta test.

FN:s globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS): Ett system för att klassificera kemikalier (ämnen och blandningar) utifrån standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker och informera om resultaten genom exempelvis piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad, i syfte att informera om kemikaliernas skadliga effekter för att skydda människor (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) och miljön (16).

UVCB-ämnena: Ämnen med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiska material.

Giltigt test: Ett test som anses vara tillräckligt relevant och tillförlitligt för ett särskilt ändamål och som är baserat på vetenskapligt sunda principer. Ett test är aldrig giltigt i absolut bemärkelse, utan endast i förhållande till ett fastställt ändamål (14).

Tillägg 2.2**KVALIFIKATIONSÄMNEN**

Innan testet som beskrivs i detta tillägg till testmetod B.71 används rutinmässigt, bör laboratoriet styrka sin tekniska kompetens genom att korrekt erhålla den förväntade U-SENSTM-prediktionen för de tio ämnen som rekommenderas i tabell 1 och genom att erhålla CV70- och EC150-värden som håller sig inom respektive referensintervall för minst åtta av de tio kvalifikationsämnena. Dessa kvalifikationsämnena har valts ut för att representera hela skalan av responser gällande risker för hudsensibilisering. Övriga urvalskriterier var att ämnena ska vara kommersiellt tillgängliga, att det ska finnas in vivo-referensdata av hög kvalitet och att det ska finnas in vitro-data av hög kvalitet genererade med U-SENSTM-testet. Det finns dessutom publicerade referensdata att tillgå för U-SENSTM-testet (1) (8).

Tabell 1: Rekommenderade ämnen för att påvisa teknisk kompetens i fråga om U-SENSTM-testet

Kvalifikations- ämne	CAS-nr	Fysikaliskt tillstånd	In vivo- prediktion ¹	U- SENS TM Lösnings- medel/ vehikel	U-SENS TM CV70- referens- intervall i µg/ml ²	U-SENS TM EC150- referens- intervall i µg/ml ²
4-fenylendiamin	106-50-3	Fast	Sensibiliserande (starkt)	Komplett medium ³	< 30	Positivt (≤ 10)
Trinitrobensensulfonsyra	2508-19-2	Flytande	Sensibiliserande (starkt)	Komplett medium	> 50	Positivt (≤ 50)
Dietylmaleat	141-05-9	Flytande	Sensibiliserande (måttligt)	DMSO	10–100	Positivt (≤ 20)
Resorcinol	108-46-3	Fast	Sensibiliserande (måttligt)	Komplett medium	> 100	Positivt (≤ 50)
Kanelalkohol	104-54-1	Fast	Sensibiliserande (svagt)	DMSO	> 100	Positivt (10–100)
4-allylanisol	140-67-0	Flytande	Sensibiliserande (svagt)	DMSO	> 100	Positivt (< 200)
Sackarin	81-07-2	Fast	Ej sensibiliserande	DMSO	> 200	Negativt (> 200)
Glycerol	56-81-5	Flytande	Ej sensibiliserande	Komplett medium	> 200	Negativt (> 200)
Mjölksyra	50-21-5	Flytande	Ej sensibiliserande	Komplett medium	> 200	Negativt (> 200)
Salicylsyra	69-72-7	Fast	Ej sensibiliserande	DMSO	> 200	Negativt (> 200)

Förkortningar: CAS-nr = nummer i registret som förs av Chemical Abstracts Service.

¹ In vivo-prediktioner gällande fara (och styrka) är baserade på LLNA-data (1) (8). In vivo-styrkan härleds med användning av de kriterier som föreslagits av ECETOC (17).

² Baserat på historiskt observerade värden (1) (8).

³ Komplet medium: RPMI-1640-medium kompletterat med 10 % fetalt kalvserum, 2 mM L-glutamin, 100 enheter/ml penicillin och 100 µg/ml streptomycin (8).

Tillägg 3

IN VITRO-TEST AVSEENDE HUDSENSIBILISERING: IL-8 LUC-TESTET

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

1. Till skillnad från tester som analyserar uttrycket av cellytemarkörer, kvantifierar IL-8 Luc-testet förändringar i uttrycket av IL-8, som är en cytokin kopplad till aktiveringen av dendritiska celler. I den på THP-1 baserade IL-8-reporter-cellinjen (THP-G8, etablerad från den humana cellinjen THP-1 med ursprung i akut monocytisk leukemi) mäts IL-8-uttrycket efter exponering för sensibiliserande ämnen (1). Uttrycket av luciferas används sedan för att understödja uppdelningen mellan hudsensibiliserande ämnen och icke-hudsensibiliserande ämnen.
2. IL-8 Luc-testet har utvärderats i en valideringsstudie (2) som genomförts av Japanese Centre for the Validation of Alternatives Methods (JaCVAM), Ministry of Economy, Trade and Industry (METI) och Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments (JSAAE) med efterföljande oberoende kollegial granskning (3) på uppdrag av JaCVAM och Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) med stöd av International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM). Med beaktande av alla tillgängliga bevis och inkomna åsikter från tillsynsmyndigheter och intressenter, anses IL-8 Luc-testet vara en användbar del av en IATA för att skilja mellan hudsensibiliserande ämnen och icke-hudsensibiliserande ämnen för faroklassificering och -märkning. Exempel på användning av data från IL-8 Luc-test i kombination med annan information finns redovisade i litteraturen (4) (5) (6).
3. IL-8 Luc-testet har visat sig vara överförbart till laboratorier som har erfarenhet av cellodling och luciferasmätning. Inom och mellan laboratorier var reproducerbarheten 87,7 % respektive 87,5 % (2). Data som erhållits från valideringsstudien (2) och andra publicerade arbeten (1) (6) visar att jämfört med LLNA-tester bedömde IL-8 Luc-testet 118 av 143 kemikalier som positiva eller negativa och 25 kemikalier som oklara, och noggrannheten hos IL-8 Luc-testet i fråga om att skilja mellan hudsensibiliserande ämnen (kategori 1 enligt GHS/CLP-förordningen) och icke-hudsensibiliserande ämnen (ingen kategori enligt GHS/CLP-förordningen) uppgår till 86 % (101/118) med en sensitivitet på 96 % (92/96) och en specificitet på 41 % (9/22). Borträknat de ämnen som ligger utanför det tillämpningsområde som beskrivs nedan (punkt 5), bedömde IL-8 Luc-testet 113 av 136 kemikalier som positiva eller negativa och 23 kemikalier som oklara, och noggrannheten hos IL-8 Luc-testet uppgår då till 89 % (101/113) med en sensitivitet på 96 % (92/96) och en specificitet på 53 % (9/17). Vid användning av data från människa enligt Urbisch m.fl. (7) bedömde IL-8 Luc-testet 76 av 90 kemikalier som positiva eller

negativa och 14 kemikalier som oklara, och noggrannheten uppgår till 80 % (61/76) med en sensitivitet på 93 % (54/58) och en specificitet på 39 % (7/18). Borträknat de ämnen som ligger utanför tillämpningsområdet, bedömde IL-8 Luc-testet 71 av 84 kemikalier som positiva eller negativa och 13 kemikalier som oklara, och noggrannheten uppgår till 86 % (61/71) med en sensitivitet på 93 % (54/58) och en specificitet på 54 % (7/13). Det är mer sannolikt att falska negativa prediktioner med IL-8 Luc-testet gäller kemikalier som uppvisar en låg/måttlig hudsensibiliserande styrka (underkategori 1B enligt GHS/CLP-förordningen) än kemikalier som uppvisar en hög hudsensibiliserande styrka (underkategori 1A enligt GHS/CLP-förordningen) (6). Sammantaget visar informationen att IL-8 Luc-testet har en uppgift att fylla i identifieringen av risker för hudsensibilisering. Noggrannheten som anges för IL-8 Luc-testet som ett fristående test är endast vägledande, eftersom testet bör beaktas i kombination med andra informationskällor inom ramen för en IATA och i enlighet med bestämmelserna i punkterna 7 och 8 i Allmän inledning. Vid utvärdering av tester utan djurförsök gällande hudsensibilisering bör man dessutom komma ihåg att såväl LLNA-testet som andra djurförsök eventuellt inte avspeglar situationen för människor fullt ut.

4. IL-8 Luc-testet har, baserat på de uppgifter som finns tillgängliga för närvarande, visat sig vara tillämpligt för testkemikalier som omfattar en rad olika organiska funktionella grupper, reaktionsmekanismer, hudsensibiliseringsstyrkor (vilket har fastställts i in vivo-undersökningar) och fysikalisk-kemiska egenskaper (2) (6).
5. Även om IL-8 Luc-testet använder X-VIVO™ 15 som lösningsmedel har det korrekt kunnat bedöma kemikalier med ett log K_{ow} -värde $> 3,5$ och kemikalier med en löslighet i vatten på runt 100 µg/ml, enligt beräkning med EPI Suite™, och testets förmåga att detektera sensibiliserande ämnen med låg löslighet i vatten är bättre än den för IL-8 Luc-test där dimetylsulfoxid (DMSO) används som lösningsmedel (2). Testkemikalier som inte löses upp vid 20 mg/ml kan dock ge falska negativa resultat, till följd av deras oförmåga att lösas upp i X-VIVO™ 15. Av detta skäl bör negativa resultat för dessa kemikalier inte tas i beaktande. En hög andel falska negativa resultat upptäcktes för anhydrider i valideringsstudien. Dessutom kan, till följd av den begränsade metaboliska kapaciteten hos cellinjen (8) och testets betingelser, prohaptener (ämnen som kräver metabolisk aktivering) och prehaptener (ämnen som aktiveras genom oxidering i luft) ge negativa resultat i testet. Även om negativa resultat för misstänkta prehaptener/prohaptener ska tolkas med försiktighet, lyckades dock IL-8 Luc-testet korrekt bedöma 11 av 11 prehaptener, 6 av 6 prohaptener och 6 av 8 pre/pro-haptener i IL-8 Luc-testets datamängd (2). Baserat på en nyligen genomförd omfattande genomgång av tre tester utan djurförsök (DPRA, KeratinoSens™ och h-CLAT) med avseende på detektering av pre- och prohaptener (9), och med utgångspunkt i det faktum att THP-G8-cellerna som används i IL-8 Luc-testet tillhör en cellinje som härrör från THP-1 som används i h-CLAT-testet, kan IL-8 Luc-testet

även bidra till att öka sensitiviteten hos tester utan djurförsök vad gäller att detektera pre- och prohaptener, i kombination med andra tester. De ytaktiva ämnen som har testats hittills gav (falska) positiva resultat, oberoende av typ (till exempel katjoniska, anjoniska eller icke-joniska). Slutligen kan kemikalier som interfererar med luciferas störa ämnets aktivitet/mätning, vilket kan orsaka skenbar inhibition eller ökad luminiscens (10). Till exempel har fytoöstrogener koncentrationer som är högre än 1 μM rapporterats störa luminiscenssignaler i andra luciferasbaserade reportergentester till följd av överaktivering av luciferasreportergenen. Därför krävs en noggrann undersökning av luciferasuttryck som erhålls vid höga koncentrationer av fytoöstrogener eller föreningar som misstänks producera en fytoöstrogenerliknande aktivering av luciferasreportergenen (11). Till följd av det ovanstående ligger ytaktiva ämnen, anhydrider och kemikalier som interfererar med luciferas utanför tillämplighetsområdet för detta test. Om det finns bevis för att IL-8 Luc-testet inte är tillämpligt för andra specifika kategorier av testkemikalier, bör det inte användas för dessa specifika kategorier.

6. Som beskrivs ovan kan IL-8 Luc-testet användas för att understödja uppdelningen mellan hudsensibiliserande ämnen och icke-hudsensibiliserande ämnen. Ytterligare arbete, företrädesvis baserat på data gällande människor, krävs för att avgöra huruvida IL-8 Luc-resultat skulle kunna bidra till bedömningar av sensibiliseringens styrka, när de beaktas i kombination med andra informationskällor.
7. Definitioner av begrepp finns i tillägg 3.1.

TESTETS PRINCIP

8. För IL-8 Luc-testet används en human cellinje med ursprung i monocytisk leukemi, THP-1, som har erhållits från American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, Förenta staterna). Med användning av denna cellinje har avdelningen för dermatologi vid Tohoku University School of Medicine tagit fram en THP-1-deriverad IL-8-reporter-cellinje, THP-G8, som innehåller luciferasgenerna SLO (Stable Luciferase Orange) och SLR (Stable Luciferase Red) som styrs av IL-8- respektive GAPDH-promotorer (glyceraldehyd-3-fosfatdehydrogenas) (1). Detta möjliggör kvantitativ mätning av luciferasgenens induktion genom detektering av luminiscensen från väletablerade ljusproducerande luciferassubstrat, som en indikator på IL-8- och GAPDH-promotorernas aktivitet i celler efter exponering för sensibiliserande kemikalier.
9. Testsystemet med dubbla färger baseras på ett luciferasenzym som sänder ut orangefärgat ljus (SLO, $\lambda_{\text{max}} = 580 \text{ nm}$) (12) för IL-8-promotorns genuttryck och ett luciferasenzym som sänder ut rött ljus (SLR, $\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$) (13) för GAPDH-promotorns genuttryck (promotorn för intern kontroll). De båda luciferasenzymerna sänder ut ljus med olika

färger när de reagerar med D-luciferin (firefly) och deras luminiscens mäts parallellt i en enstegsreaktion genom att ljuset från testblandningen delas upp med ett optiskt filter (14) (se tillägg 3.2).

10. THP-G8-celler behandlas under 16 timmar med testkemikalien, varefter SLO-luciferasaktiviteten (SLO-LA), som återspeglar IL-8-promotorns aktivitet, och SLR-luciferasaktiviteten (SLR-LA), som återspeglar GAPDH-promotorns aktivitet, mäts. För att göra förkortningarna enkla att förstå kallas SLO-LA och SLR-LA för IL8LA respektive GAPLA nedan. I tabell 1 finns en beskrivning av de termer som är associerade med luciferasaktiviteten i IL-8 Luc-testet. De uppmätta värdena används för att beräkna normaliserad IL8LA (nIL8LA), som är förhållandet mellan IL8LA och GAPLA, induktionen av nIL8LA (Ind-IL8LA), som är förhållandet mellan de aritmetiska medelvärdena för fyrfaldigt uppmätta nIL8LA-värden för THP-G8-celler behandlade med en testkemikalie och nIL8LA-värdena för obehandlade THP-G8-celler, samt inhiberingen av GAPLA (Inh-GAPLA), som är förhållandet mellan de aritmetiska medelvärdena för fyrfaldigt uppmätta GAPLA-värden för THP-G8-celler behandlade med en testkemikalie och GAPLA-värdena för obehandlade THP-G8-celler, som används som en indikator på cytotoxicitet.

Tabell 1: Beskrivning av termer som är associerade med luciferasaktiviteten i IL-8 Luc-testet

Förkortning	Definition
GAPLA	SLR-luciferasaktivitet som återspeglar GAPDH-promotorns aktivitet
IL8LA	SLO-luciferasaktivitet som återspeglar IL-8-promotorns aktivitet
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA för THP-G8-celler behandlade med kemikalier/nIL8LA för obehandlade celler
Inh-GAPLA	GAPLA för THP-G8-celler behandlade med kemikalier/GAPLA för obehandlade celler
CV05	Den lägsta koncentration av kemikalien vid vilken Inh-GAPLA blir < 0,05

11. Prestandastandarder (PS) (15) finns tillgängliga för att underlätta valideringen av modifierade in vitro-tester avseende IL-8-luciferas som liknar IL-8 Luc-testet, och för att möjliggöra snabba ändringar av OECD:s testriktlinje 442E för att inbegripa dessa. Ömsesidigt erkännande av data (MAD) enligt OECD-avtalet garanteras endast för tester som validerats enligt prestandastandarderna och om de har granskats och inbegripits i testriktlinje 442E av OECD (16).

DEMONSTRATION AV KOMPETENS

12. Innan testet som beskrivs i detta tillägg till testmetod B.71 används rutinmässigt, bör laboratoriet styrka sin tekniska kompetens med användning av de tio kvalifikationsämnen som anges i tillägg 3.3, i enlighet med god praxis för in vitro-metoder (17). Dessutom bör användare av testet föra en historisk databas över data som erhålls genom reaktivitetskontrollerna (se punkt 15) och genom de positiva kontrollerna och lösningsmedels-/vehikelkontrollerna (se punkterna 21–24) och använda dessa data för att styrka att testets reproducerbarhet bibehålls i laboratoriet över tid.

FÖRFARANDE

13. Ett standardförfarande (SOP) för IL-8 Luc-testet finns att tillgå och bör användas när testet utförs (18). Laboratorier som vill utföra testet kan erhålla den rekombinanta THP-G8-cellinjen från GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan, efter att ha undertecknat ett avtal om materialöverföring (Material Transfer Agreement, MTA) i enlighet med OECD-mallens villkor. I de följande punkterna ges en beskrivning av de viktigaste delarna i och förfarandena för testet.

Förberedelse av celler

14. THP-G8-cellinjen från GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan, ska användas vid utförandet av IL-8 Luc-testet (se punkterna 8 och 13). När cellerna har tagits emot förökas de (två till fyra passager) och lagras frysta som en enhetlig stam. Celler från denna stam kan förökas genom maximalt tolv passager eller under maximalt sex veckor. Odlingsmediet som ska användas för förökningen är RPMI-1640-medium innehållande 10 % fetalt bovint serum (FBS), lösning med antibiotika/antimykotika (100 enheter/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin och 0,25 µg/ml amfotericin B i 0,85-procentig saltlösning) (till exempel GIBCO katalognr 15240-062), 0,15 µg/ml Puromycin (till exempel CAS-nr 58-58-2) och 300 µg/ml G418 (till exempel CAS-nr 108321-42-2).
15. Innan cellerna används för testning bör de genomgå en kvalificering i form av en reaktivitetskontroll. Denna kontroll bör utföras 1–2 veckor eller 2–4 passager efter upptining med användning av den positiva kontrollen 4-nitrobensylbromid (4-NBB) (CAS-nr 100-11-8, ≥ 99 % renhet) och den negativa kontrollen mjölksyra (CAS-nr 50-21-5, ≥ 85 % renhet). 4-NBB ska ge en positiv respons för Ind-IL8LA ($\geq 1,4$) medan mjölksyra ska ge en negativ respons för Ind-IL8LA ($< 1,4$). Endast celler som har klarat reaktivitetskontrollen ska användas för testet. Kontrollen bör utföras i enlighet med de förfaranden som beskrivs i punkterna 22–24.
16. För testet sås THP-G8-celler ut med en densitet på 2 till 5×10^5 celler/ml, varefter de förödlas i odlingsflaskor under 48 till 96 timmar. På testdagen tvättas skördade celler från odlingsflaskan med RPMI-1640 innehållande 10 % FBS men utan innehåll av antibiotika

och resuspenderas sedan i RPMI-1640 innehållande 10 % FBS men utan innehåll av antibiotika till densiteten 1×10^6 celler/ml. Därefter fördelas cellerna i en flatbottnad svart 96-hålsplatta (till exempel Costar katalognr 3603) med 50 µl per brunn (5×10^4 celler/brunn).

Beredning av testkemikalie och kontrollämnena

17. Testkemikalien och kontrollämnena bereds på testdagen. För IL-8 Luc-testet löses testkemikalien upp i X-VIVO™ 15, som är ett kommersiellt tillgängligt serumfritt medium (Lonza, 04-418Q), till en slutlig koncentration på 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 tillsätts till 20 mg av testkemikalien (oavsett kemikaliens löslighet) i ett mikrocentrifugrör till en total volym på 1 ml, varefter röret roteras kraftigt och skakas i en rotor med en maximal hastighet på 8 varv per minut under 30 minuter vid en rumstemperatur på ungefär 20 °C. Om fasta kemikalier fortfarande är olösta ska röret dessutom ultraljudsbehandlas till dess att kemikalien har lösts upp helt och hållet eller är dispergerad i en stabil dispersion. För testkemikalier som är lösliga i X-VIVO™ 15 späds lösningen med en faktor 5 med X-VIVO™ 15 och används som en X-VIVO™ 15-stamlösning av testkemikalien (4 mg/ml). För testkemikalier som inte är lösliga i X-VIVO™ 15 roteras blandningen igen under minst 30 minuter och centrifugeras sedan vid 15 000 varv per minut ($\approx 20\,000\text{ g}$) under 5 minuter; den resulterande supernatanten används som en X-VIVO™ 15-stamlösning av testkemikalien. För användning av andra lösningsmedel, som DMSO, vatten eller odlingsmedium, ska en vetenskaplig motivering tillhandahållas. Det detaljerade förfarandet för att lösa upp kemikalier beskrivs i tillägg 3.5. X-VIVO™ 15-lösningarna som beskrivs i punkterna 18–23 blandas 1:1 (volymförhållande) med de cellsuspensioner som beretts i en flatbottnad svart 96-hålsplatta (se punkt 16).
18. Den första testomgången syftar till att fastställa den cytotoxiska koncentrationen och att undersöka hudsensibiliseringspotentialen hos kemikalier. Med användning av X-VIVO™ 15 görs serieutspädningar av X-VIVO™ 15-stamlösningarna av testkemikalierna med en utspädningsfaktor 2 (se tillägg 3.5), och för detta används en 96-hålsplatta (till exempel Costar katalognr EW-01729-03). Därefter tillsätts 50 µl utspädd lösning per brunn till 50 µl cellsuspension i en flatbottnad svart 96-hålsplatta. För testkemikalier som är lösliga i X-VIVO™ 15 sträcker sig därför de slutliga koncentrationerna av testkemikalierna från 0,002 till 2 mg/ml (se tillägg 3.5). För testkemikalier som inte är lösliga i X-VIVO™ 15 vid 20 mg/ml fastställs endast utspädningsfaktorer som sträcker sig från 2 till 2^{10} , även om de faktiska slutliga koncentrationerna av testkemikalierna förblir osäkra och är beroende av den mättade koncentrationen av testkemikalierna i X-VIVO™ 15-stamlösningen.
19. För de efterföljande testomgångarna (det vill säga de andra, tredje och fjärde replikaten) bereds X-VIVO™ 15-stamlösningen vid en koncentration som är fyra gånger högre än koncentrationen CV05 (cellviabilitet 05, den lägsta koncentration vid vilken Inh-GAPLA

blir $< 0,05$) i det första experimentet. Om Inh-GAPLA inte sjunker under 0,05 vid den högsta koncentrationen i den första testomgången, bereds X-VIVO™ 15-stamlösningen vid den första testomgångens högsta koncentration. Koncentrationen CV05 beräknas genom att koncentrationen hos stamlösningen i den första testomgången divideras med utspädningsfaktorn för CV05 (X) (utspädningsfaktorn för CV05 [X] är den utspädningsfaktor som krävs för att späda stamlösningen till CV05) (se tillägg 3.5). För testkemikalier som inte är lösliga i X-VIVO™ 15 vid 20 mg/ml fastställs CV05 utifrån koncentrationen hos stamlösningen $\times 1/X$. För testomgångarna två till fyra bereds en andra stamlösning med koncentrationen $4 \times CV05$ (se tillägg 3.5).

20. Serieutspädningarna av denna andra X-VIVO™ 15-stamlösning görs med en utspädningsfaktor på 1,5 med användning av en 96-hålsplatta. Därefter tillsätts 50 µl utspädd lösning per brunn till 50 µl cellsuspension i brunnarna i en flatbottnad svart 96-hålsplatta. Varje koncentration av varje testkemikalie ska testas i fyra brunnar. Proverna blandas sedan med en plattskakare och inkuberas under 16 timmar vid 37 °C i en atmosfär med 5 % CO₂, varefter luciferasaktiviteten mäts enligt beskrivningen nedan.
21. Lösningssmedelskontrollen är en blandning av 50 µl/brunn med X-VIVO™ 15 och 50 µl/brunn med cellsuspension i RPMI-1640 innehållande 10 % FBS.
22. Den rekommenderade positiva kontrollen är 4-NBB. 20 mg 4-NBB bereds i ett mikrocentrifugrör på 1,5 ml, till vilket X-VIVO™ 15 tillsätts till en total volym på 1 ml. Röret roteras kraftigt och skakas i en rotor med en maximal hastighet på 8 varv per minut under minst 30 minuter. Efter centrifugering vid 20 000 g under fem minuter späds supernatanten med en faktor 4 med X-VIVO™ 15, varpå 500 µl av den utspädda supernatanten överförs till en brunn i en 96-hålsplatta. Den utspädda supernatanten späds ytterligare med X-VIVO™ 15 med faktorerna 2 och 4, varefter 50 µl av lösningen tillsätts till 50 µl THP-G8-cellsuspension i brunnarna på en flatbottnad svart 96-hålsplatta (se tillägg 3.6). Varje koncentration av den positiva kontrollen ska testas i fyra brunnar. Plattan skakas i en plattskakare och inkuberas i en CO₂-inkubator under 16 timmar (37 °C, 5 % CO₂), varefter luciferasaktiviteten mäts enligt beskrivningen i punkt 29.
23. Den rekommenderade negativa kontrollen är mjölksyra. 20 mg mjölksyra bereds i ett mikrocentrifugrör på 1,5 ml, till vilket X-VIVO™ 15 tillsätts till en total volym på 1 ml (20 mg/ml). Mjölksyralösningen på 20 mg/ml späds sedan med en faktor 5 med X-VIVO™ 15 (till 4 mg/ml), varpå 500 µl av denna mjölksyralösning på 4 mg/ml överförs till en brunn i en 96-hålsplatta. Denna lösning späds med en faktor 2 med X-VIVO™ 15 och därefter igen med en faktor 2, för att ge lösningar på 2 mg/ml och 1 mg/ml. 50 µl av dessa tre lösningar och vehikelkontrollen (X-VIVO™ 15) tillsätts till 50 µl THP-G8-cellsuspension i brunnarna på en flatbottnad svart 96-hålsplatta. Varje koncentration av den negativa kontrollen testas i fyra brunnar. Plattan skakas i en plattskakare och inkuberas

i en CO₂-inkubator under 16 timmar (37 °C, 5 % CO₂), varefter luciferasaktiviteten mäts enligt beskrivningen i punkt 29.

24. Andra lämpliga positiva eller negativa kontroller kan användas om historiska data finns att tillgå för att härleda jämförbara acceptanskriterier.
25. Se till att flyktiga testkemikalier inte avdunstar och att det inte sker någon korskontaminering mellan testkemikalier i olika brunnar, till exempel genom att plattan förseglas innan testkemikalierna inkuberas.
26. Testkemikalierna och lösningsmedelskontrollen kräver två till fyra testomgångar för att få fram en positiv eller negativ prediktion (se tabell 2). Alla testomgångar ska utföras på olika dagar med färsk X-VIVO™ 15-stamlösningar av testkemikalierna och oavhängigt skördade celler. Cellerna får dock komma från samma passage.

Mätning av luciferasaktiviteten

27. Luminiscensen mäts med användning av en luminometer för 96-hålsmikrotiterplattor som är försedd med optiska filter, till exempel Phelios (ATTO, Tokyo, Japan), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Tyskland) eller ARVO-serien (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, Förenta staterna). Luminometern måste kalibreras inför varje test för att säkerställa reproducerbarheten (19). Rekombinanta luciferaser som avger orange- och rödfärgat ljus finns att tillgå för denna kalibrering.
28. 100 µl förvämt Tripluc®-reagens för luciferastest (Tripluc) överförs till varje brunn i plattan som innehåller cellsuspension, oavsett om den är behandlad med kemikalien eller inte. Plattan skakas under tio minuter vid en rumstemperatur på ungefär 20 °C. Därefter placeras plattan i luminometern för mätning av luciferasaktiviteten. Bioluminiscensen mäts utan (F0) respektive med (F1) det optiska filtret, under tre sekunder vardera. Om alternativa inställningar eller metoder används, till exempel till följd av den använda luminometermodellen, ska detta motiveras.
29. Parametrar för varje koncentration beräknas utifrån de uppmätta värdena, till exempel IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, genomsnittlig $\pm$ SD (standardavvikelse) för IL8LA, genomsnittlig $\pm$ SD för GAPLA, genomsnittlig $\pm$ SD för nIL8LA, genomsnittlig $\pm$ SD för Ind-IL8LA, genomsnittlig $\pm$ SD för Inh-GAPLA och det 95-procentiga konfidensintervallet för Ind-IL8LA. Definitioner av parametrarna som används i denna punkt finns i tillägg 1 respektive tillägg 4.
30. Innan mätningen startar görs vanligtvis, för reportertester med flera olika färger, en färgseparering med hjälp av detektorer (luminometer och plattavläsare) som har försetts med optiska filter, till exempel filter som blockerar korta eller långa våglängder (långpass-

eller kortpassfilter) eller bandpassfilter. Transmissionskoefficienterna för filtren för varje bioluminiscens-signalfärg bör kalibreras innan testet utförs, enligt tillägg 3.2.

DATA OCH RAPPORTERING

Utvärdering av data

31. Kriterierna för en positiv/negativ bedömning är, för varje testomgång, enligt följande:

- En prediktion i ett IL-8 Luc-test bedöms som positiv om en testkemikalie har ett Ind-IL8LA-värde $\geq 1,4$ och den nedre gränsen för det 95-procentiga konfidensintervallet för Ind-IL8LA är $\geq 1,0$.
- En prediktion i ett IL-8 Luc-test bedöms som negativ om en testkemikalie har ett Ind-IL8LA-värde $< 1,4$ och/eller den nedre gränsen för det 95-procentiga konfidensintervallet för Ind-IL8LA är $< 1,0$.

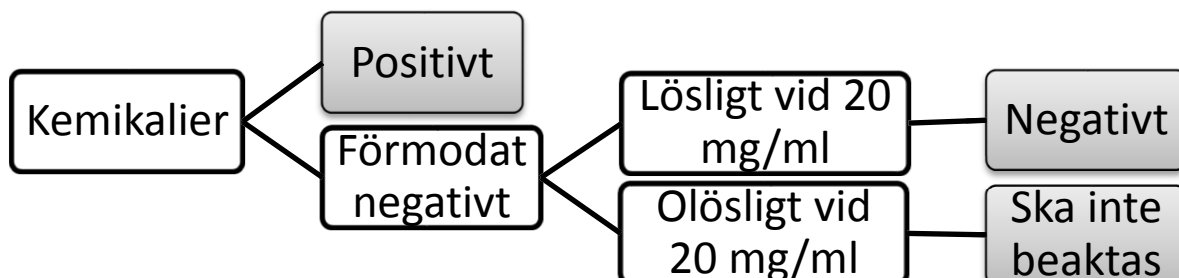
Prediktionsmodell

32. Testkemikalier som uppvisar två positiva resultat bland testomgångarna 1, 2, 3 och 4 identifieras som positiva, medan de som uppvisar tre negativa resultat bland testomgångarna 1, 2, 3 och 4 identifieras som förmodat negativa (se tabell 2). Bland de förmodat negativa kemikalierna bedöms kemikalier som löses upp vid koncentrationen 20 mg/ml i X-VIVO™ 15 som negativa, medan kemikalier som inte löses upp vid koncentrationen 20 mg/ml i X-VIVO™ 15 inte ska tas i beaktande (se figur 1).

Tabell 2: Kriterier för att identifiera positivt resultat och förmodat negativt resultat

Testomgång 1	Testomgång 2	Testomgång 3	Testomgång 4	Slutlig prediktion
Positivt	Positivt	–	–	Positivt
	Negativt	Positivt	–	Positivt
		Negativt	Positivt	Positivt
		Negativt	Negativt	Förmodat negativt
Negativt	Positivt	Positivt	–	Positivt
		Negativt	Positivt	Positivt
		Negativt	Negativt	Förmodat negativt
	Negativt	Positivt	Positivt	Positivt
		Negativt	Negativt	Förmodat negativt
		Negativt	–	Förmodat negativt

Figur 1: Prediktionsmodell för slutlig bedömning



Acceptanskriterier

33. Följande acceptanskriterier ska vara uppfyllda vid användning av IL-8 Luc-testet:

- Ind-IL8LA ska vara högre än 5,0 för åtminstone en av koncentrationerna av den positiva kontrollen, 4-NBB, i varje testomgång.
- Ind-IL8LA ska vara lägre än 1,4 för varje koncentration av den negativa kontrollen, mjölksyra, i varje testomgång.
- Data från plattor för vilka GAPLA-värdet för kontrollbrunnar med celler och Tripluc men utan testkemikalier är mindre än 5 gånger värdet för brunnar som endast innehåller testmedium (50 µl/hål med RPMI-1640 innehållande 10 % FBS och 50 µl/brunn med X-VIVO™ 15) ska kasseras.
- Data från plattor för vilka Inh-GAPLA-värdet för alla koncentrationer av test- eller kontrollkemikalierna är lägre än 0,05 ska kasseras. När så är fallet ska det första testet upprepas, så att den högsta slutliga koncentrationen för det upprepade testet är den lägsta slutliga koncentrationen för det föregående testet.

Testrapport

34. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalier

Monokomponentämne:

- Kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel och/eller andra identifieringar.

- Fysiskt utseende, vattenlöslighet, molekylvikt och andra relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Renhet, kemisk identitet för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.
- Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning eller finfördelning).
- Löslighet i X-VIVO™ 15. För kemikalier som är olösliga i X-VIVO™ 15, huruvida fällning eller flotation observeras efter centrifugering.
- Testad koncentration/testade koncentrationer.
- Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Motivering för valet av lösningsmedel/vehikel för varje testkemikalie om X-VIVO™ 15 inte har använts.

Multikomponentämne, UVCB och blandning:

- Karakteriseras så långt det är möjligt genom exempelvis kemisk identitet (se ovan), renhet, kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper (se ovan) hos beståndsdelarna, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Fysiskt utseende, vattenlöslighet och andra relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Molekylvikt eller uppskattad molekylvikt för blandningar/polymerer med kända sammansättningar eller annan information som är relevant för utförandet av undersökningen.
- Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning eller finfördelning).
- Löslighet i X-VIVO™ 15. För kemikalier som är olösliga i X-VIVO™ 15, huruvida fällning eller flotation observeras efter centrifugering.
- Testad koncentration/testade koncentrationer.
- Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Motivering för valet av lösningsmedel/vehikel för varje testkemikalie om X-VIVO™ 15 inte har använts.

Kontroller

Positiv kontroll:

- Kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel och/eller andra identifieringar.
- Fysiskt utseende, vattenlöslighet, molekylvikt och andra relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga och när så är tillämpligt.
- Renhet, kemisk identitet för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.
- Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning eller finfördelning).
- Testad koncentration/testade koncentrationer.
- Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Hänvisning till tidigare resultat för positiv kontroll som visar på lämpliga acceptanskriterier, om detta är tillämpligt.

Negativ kontroll:

- Kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer och/eller andra identifieringar.
- Renhet, kemisk identitet för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.
- Fysiskt utseende, molekylvikt och andra relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper om andra negativa kontroller än de som anges i testriktlinjen används och i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Motivering för valet av lösningsmedel för varje testkemikalie.

Testbetingelser

- Namn och adress för sponsor, testanläggning och försöksledare.
- Beskrivning av testet som använts.
- Använd cellinje samt dess lagringsförhållanden och källa (till exempel den anläggning varifrån cellinjen erhöles).
- Partinummer och ursprung för FBS, namn på leverantör, partinummer för flatbottnad svart 96-hålsplatta och partinummer för Tripluc-reagens.
- Passageantal och celldensitet som används för testet.

- Cellräkningsmetod som använts för utsådden före testet, samt vidtagna åtgärder för att säkerställa en homogen fördelning av celler.
- Använd luminometer (till exempel modell), inklusive instrumentinställningar och använt luciferassubstrat, samt ett uppvisande av korrekta luminiscensmätningar baserat på det kontrolltest som beskrivs i tillägg 3.2.
- Det förfarande som använts för att visa att laboratoriet är kvalificerat att utföra testet (till exempel genom test av kvalifikationsämnen) eller för att visa att testet kan reproduceras över tid.

Testförfarande

- Antal replikat och genomförda testomgångar.
- Testkemikaliens koncentrationer, appliceringsförfarande och exponeringstid (vid avvikelse från rekommendationerna).
- Beskrivning av de utvärderings- och beslutskriterier som använts.
- Beskrivning av de använda acceptanskriterierna för undersökningen.
- Beskrivning av eventuella modifieringar av testförfarandet.

Resultat

- Mätresultat för IL8LA och GAPLA.
- Beräkningar av nIL8LA, Ind-IL8LA och Inh-GAPLA.
- Det 95-procentiga konfidensintervallet för Ind-IL8LA.
- Ett diagram som visar dos-effektkurvorna för induktionen av luciferasaktivitet samt viabilitet.
- Beskrivning av andra relevanta observationer, i förekommande fall.

Diskussion kring resultaten

- Diskussion kring de resultat som har erhållits med IL-8 Luc-testet.
- Beaktande av testets resultat inom ramen för en IATA, om annan relevant information finns att tillgå.

Slutsats

LITTERATUR

- (1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K och Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci* 124:359-69.
- (2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris. Finns på <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris. Finns på <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris. Finns på <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H och 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 och 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 m.fl. (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 och 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 och 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 och 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 och 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 och 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 och 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). Ska publiceras – 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, Frankrike.
- (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, Frankrike.
- (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. Organisationen för

ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris. Finns på http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol. Finns på http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

(19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR och Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochem Photobiol* 86:1046-9.

(20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris, Frankrike.

(21) Förenta nationerna (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS, det globalt harmoniserade systemet för klassificering och märkning av kemikalier). Sjätte reviderade utgåvan. New York och Genève: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Finns på http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Tillägg 3.1

DEFINITIONER

Noggrannhet: Anger hur väl testresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Det är ett mått på testets prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med ett test (16).

AOP (Adverse Outcome Pathway): Sekvens av händelser, från den kemiska strukturen hos en målkemikalie eller en grupp av liknande kemikalier, genom den molekylära inledande händelsen och fram till ett in vivo-resultat av intresse (20).

Kemikalie: Ett ämne eller en blandning.

CV05: Cellviabilitet 05, det vill säga den lägsta koncentration vid vilken kemikalier uppvisar ett Inh-GAPLA-värde som är lägre än 0,05.

FInSLO-LA: Förkortning som används i valideringsrapporten och i tidigare publikationer gällande IL-8 Luc-testet med samma betydelse som Ind-IL8LA. Se Ind-IL8LA för närmare definition.

GAPLA: SLR-luciferasaktivitet ($\lambda_{\max} = 630 \text{ nm}$) som styrs av GAPDH-promotorn och som indikerar cellviabiliteten och antalet viabla celler.

Fara: Inneboende egenskap hos ett ämne eller en situation som har potential att orsaka skadliga effekter när en organism, ett system eller en (del-)population exponeras för ämnet.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): En strukturerad strategi som används för identifiering av fara (risk), karakterisering av fara (styrka) och/eller säkerhetsbedömning (risk/styrka och exponering) för en kemikalie eller en grupp av kemikalier, som strategiskt integrerar och väger in alla relevanta data som underlag för tillsynsbeslut om potentiell fara och/eller risk och/eller om behovet av ytterligare riktad och därigenom minimerad testning.

II-SLR-LA: Förkortning som används i valideringsrapporten och i tidigare publikationer gällande IL-8 Luc-testet med samma betydelse som Inh-GAPLA. Se Inh-GAPLA för närmare definition.

IL-8 (Interleukin-8): En cytokin som erhålls från endotelceller, fibroblaster, keratinocyter, makrofager och monocyter som orsakar kemotaxis hos neutrofiler och T-lymfocyter.

IL8LA: SLO-luciferasaktivitet ($\lambda_{\max} = 580 \text{ nm}$) som styrs av IL-8-promotorn.

Ind-IL8LA: Induktionsförhållande för IL8LA. Värdet erhålls genom att nIL8LA-värdet för THP-G8-celler behandlade med kemikalier divideras med motsvarande värde för icke-

stimulerade THP-G8-celler och representerar induktionen av IL-8-promotoraktivitet till följd av kemikalier.

Inh-GAPLA: Inhibering av GAPLA. Värdet erhålls genom att GAPLA-värdet för THP-G8-celler behandlade med kemikalier divideras med GAPLA-värdet för obehandlade THP-G8-celler och representerar kemikaliernas cytotoxicitet.

Lägsta gränsvärde för induktion (MIT, Minimum Induction Threshold): Den lägsta koncentration vid vilken en kemikalie uppfyller kriteriet för positivt resultat.

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

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

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

nIL8LA: SLO-luciferasaktiviteten som återspeglar IL-8-promotorns aktivitet (IL8LA) normaliserad genom SLR-luciferasaktiviteten som återspeglar GAPDH-promotorns aktivitet (GAPLA). Värdet representerar IL-8-promotorns aktivitet efter beaktande av cellviabilitet eller cellantal.

nSLO-LA: Förkortning som används i valideringsrapporten och i tidigare publikationer gällande IL-8 Luc-testet med samma betydelse som nIL8LA. Se nIL8LA för närmare definition.

Positiv kontroll: Ett replikat som innehåller testsystemets alla komponenter och som behandlats med ett ämne som man vet ger en positiv respons. För att säkerställa att variationer i den positiva kontrollens respons över tid kan bedömas, bör den positiva responsen inte vara alltför kraftfull.

Prehaptener: Kemikalier som blir sensibiliserande ämnen genom abiotisk omvandling.

Prohaptener: Kemikalier som kräver enzymatisk aktivering för att deras hudsensibiliserande potential ska aktiveras.

Relevans: Beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida det är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur pass väl man genom testet korrekt kan mäta eller prediktera den biologiska effekt det gäller. Relevansen omfattar även överväganden om ett tests noggrannhet (konkordans) (16).

Tillförlitlighet: Mått på i vilken utsträckning ett test kan reproduceras inom och mellan

laboratorier över tid, när det utförs med användning av samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier och repeterbarheten inom laboratorier (16).

Testomgång: En testomgång utgörs av att en eller flera testkemikalier testas parallellt med en lösningsmedels-/vehikelkontroll och en positiv kontroll.

Sensitivitet: Den andel av alla positiva/aktiva kemikalier som klassificeras korrekt av testet. Känsligheten är ett mått på noggrannheten hos ett test som ger kategoriserande resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av ett tests relevans (16).

SLO-LA: Förkortning som används i valideringsrapporten och i tidigare publikationer gällande IL-8 Luc-testet med samma betydelse som IL8LA. Se IL8LA för närmare definition.

SLR-LA: Förkortning som används i valideringsrapporten och i tidigare publikationer gällande IL-8 Luc-testet med samma betydelse som GAPLA. Se GAPLA för närmare definition.

Lösningsmedels-/vehikelkontroll: Ett obehandlat prov som innehåller alla komponenter i ett testsystem förutom testkemikalien, men med det lösningsmedel/den vehikel som används. Lösningsmedels-/vehikelkontrollen används för att fastställa grundresponsen för de prover som behandlas med testkemikalien som är upplöst eller dispergerad i en stabil dispersion i samma lösningsmedel/vehikel. Vid test med en parallell mediumkontroll, visar provet också huruvida lösningsmedlet/vehikeln interagerar med testsystemet.

Specificitet: Den andel av alla negativa/inaktiva kemikalier som klassificeras korrekt av testet. Specificiteten är ett mått på noggrannheten hos ett test som ger kategoriserande resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av ett tests relevans (16).

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

Ytaktivt ämne: Ett ämne, exempelvis ett rengöringsmedel, som kan minska en vätskas ytspänning så att vätskan kan löddra eller penetrera fasta ämnen; kallas även tensid eller vätmiddel. (Testriktlinje 437)

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med detta test.

THP-G8: En IL-8-reportercellinje som används i IL-8 Luc-testet. Den utgår från den humana makrofagliknande cellinjen THP-1 som sedan transfekterats med luciferasgenerna SLO och SLR, styrda av promotorerna IL-8 respektive GAPDH.

FN:s globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS): Ett system för att klassificera kemikalier (ämnen och blandningar) utifrån standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker och informera om resultaten genom exempelvis piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad, i syfte att informera om kemikaliernas skadliga effekter för att skydda människor (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) och miljön (21).

UVCB-ämnen: Ämnen med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiska material.

Giltigt test: Ett test som anses vara tillräckligt relevant och tillförlitligt för ett särskilt ändamål och som är baserat på vetenskapligt sunda principer. Ett test är aldrig giltigt i absolut bemärkelse, utan endast i förhållande till ett fastställt ändamål.

Tillägg 3.2

PRINCIP FÖR MÄTNING AV LUCIFERASAKTIVITET OCH FASTSTÄLLANDE AV TRANSMISSIONSKOEFFICIENTER FÖR OPTISKA FILTER FÖR SLO OCH SLR

Multireporter-testsystemet Tripluc (MultiReporter Assay System – Tripluc) kan användas med en luminometer för mikrotiterplattor som har ett flerfäragsdetektorsystem som går att förse med ett optiskt filter (till exempel Phelios AB-2350 [ATTO], ARVO [PerkinElmer] eller Tristar LB941 [Berthold]). Det optiska filter som används vid mätningen är ett lång- eller kortpassfilter på 600–620 nm eller ett bandpassfilter på 600–700 nm.

Mätning av luciferas med två färger med hjälp av ett optiskt filter

Nedan beskrivs ett exempel med användning av Phelios AB-2350 (ATTO). Denna luminometer är försedd med ett långpassfilter på 600 nm (R60 HOYA Co., 600 nm LP, filter 1) för att dela upp luminiscensen mellan SLO ($\lambda_{\max} = 580$ nm) och SLR ($\lambda_{\max} = 630$ nm).

För att fastställa transmissionskoefficienterna för långpassfiltret på 600 nm behöver man, med användning av renade SLO- och SLR-luciferasenzymer, i) mäta intensiteten hos SLO- och SLR-bioluminiscensen utan filter (F0), ii) mäta intensiteten hos SLO- och SLR-bioluminiscensen efter att ljuset har passerat genom långpassfiltret på 600 nm (filter 1) och iii) beräkna transmissionskoefficienterna för långpassfiltret på 600 nm för SLO och SLR, enligt instruktionerna nedan.

Transmissionskoefficienter		Förkortning	Definition
SLO	Transmissionskoefficient för filter 1	κO_{R60}	Filtrets transmissionskoefficient för SLO
SLR	Transmissionskoefficient för filter 1	κR_{R60}	Filtrets transmissionskoefficient för SLR

När intensiteten för SLO och SLR i provet definieras som O respektive R beskrivs i) intensiteten hos ljuset utan filter (helt optiskt), F0, och ii) intensiteten hos ljuset som passerar genom långpassfiltret på 600 nm (filter 1), F1, enligt nedan.

$$F0 = O + R$$

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

Dessa formler kan även formuleras om på följande sätt:

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

Med användning av de beräknade transmissionsfaktorerna (κO_{R60} och κR_{R60}) och de uppmätta värdena F0 och F1 går det sedan att beräkna O- och R-värdena enligt följande:

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

Material och metoder för att fastställa transmissionsfaktorer

1) Reagenser

Enkla renade luciferasenymer:

Frystorkat renat SLO-enzym

Frystorkat renat SLR-enzym

(som för valideringsarbetet erhöles från GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan, med användning av THP-G8-cellinjen)

Testreagens:

Tripluc[®]-reagens för luciferastest (till exempel från TOYOBO, katalognr MRA-301)

Medium: för luciferastest (30 ml, förvarat vid 2–8 °C)

Reagens	Konc.	Slutlig konc. i medium	Mängd som behövs
RPMI-1640	–	–	27 ml
FBS	–	10 %	3 ml

2) Beredning av enzymlösning:

Lös upp frystorkat renat luciferasenzym i ett provrör genom att tillsätta 200 µl 10–100 mM Tris-HCl eller Hepes-HCl (pH 7,5–8,0) som har kompletterats med 10 % (vikt/volym) glycerol, dela upp enzymlösningen i aliquoter om 10 µl i engångsprövrör på 1,5 ml och förvara dem i frys vid –80 °C. Den frysta enzymlösningen kan användas i upp till sex månader. Vid användning tillsätts 1 ml medium för luciferastest (RPMI-1640 med 10 % FBS) till varje provrör som innehåller enzymlösning (utspädd enzymlösning), varpå provrören förvaras på is för att förhindra deaktivering.

3) Mätning av bioluminescens

Tina upp Tripluc[®]-reagens för luciferastest (Tripluc) och förvara reagensen i rumstemperatur, antingen i ett vattenbad eller på en plats där den omgivande luften har rumstemperatur. Sätt på luminometern 30 minuter innan mätningen ska börja, så att fotomultiplikatorn får tid att stabiliseras. Överför 100 µl av den utspädda

enzymlösningen till en svart 96-hålsplatta (flatbottnad) (SLO-referensprov till #B1, #B2 och #B3, och SLR-referensprov till #D1, #D2 och #D3). Överför därefter 100 µl förvärmad Tripluc till var och en av brunnarna i plattan som innehåller utspädd enzymlösning, med hjälp av en pipett. Skaka plattan under 10 minuter vid rumstemperatur (ungefär 25 °C) med hjälp av en plattskakare. Avlägsna eventuella bubblor från lösningarna i brunnarna. Placera plattan i luminometern för att mäta luciferasaktiviteten. Bioluminiscensen mäts utan (F0) respektive med (F1) det optiska filtret, under tre sekunder vardera.

Transmissionskoefficienten för det optiska filtret beräknas enligt följande:

$$\text{Transmissionskoefficient (SLO } [\kappa_{O_{R60}}]) = (\#B1 \text{ vid F1} + \#B2 \text{ vid F1} + \#B3 \text{ vid F1}) / (\#B1 \text{ vid F0} + \#B2 \text{ vid F0} + \#B3 \text{ vid F0})$$

$$\text{Transmissionskoefficient (SLR } [\kappa_{O_{R60}}]) = (\#D1 \text{ vid F1} + \#D2 \text{ vid F1} + \#D3 \text{ vid F1}) / (\#D1 \text{ vid F0} + \#D2 \text{ vid F0} + \#D3 \text{ vid F0})$$

De beräknade transmissionsfaktorerna används för alla mätningar som utförs med användning av samma luminometer.

Kvalitetskontroll för utrustning

De förfaranden som beskrivs i IL-8 Luc-protokollet bör användas (18).

Tillägg 3.3

KVALIFIKATIONSÄMNEN

Innan testet som beskrivs i detta tillägg till testmetod B.71 används rutinmässigt, bör laboratoriet styrka sin tekniska kompetens genom att erhålla den förväntade IL-8 Luc-prediktionen för de tio ämnen som rekommenderas i tabell 1 och genom att erhålla värden som håller sig inom respektive referensintervall för minst åtta av de tio kvalifikationsämnena (som är utvalda för att representera hela skalan av responser gällande risker för hudsensibilisering). Övriga urvalskriterier var att ämnena ska vara kommersiellt tillgängliga, att det ska finnas in vivo-referensdata av hög kvalitet och att det ska finnas in vitro-data av hög kvalitet genererade med IL-8 Luc-testet. Det finns dessutom publicerade referensdata att tillgå för IL-8 Luc-testet (1) (6).

Tabell 1: Rekommenderade ämnen för att påvisa teknisk kompetens i fråga om IL-8 Luc-testet

Kvalifikationsämne	CAS-nr	Fysikaliskt tillstånd	Löslighet i X-VIVO™ 15 vid 20 mg/ml	In vivo-prediktion ¹	IL-8 Luc-prediktion ²	Referensintervall (µg/ml) ³	
						CV05 ⁴	IL-8 Luc MIT ⁵
2,4-dinitroklorbensen	97-00-7	Fast	Olösligt	Sensibiliserande (extremt)	Positiv	2,3–3,9	0,5–2,3
Formaldehyd	50-00-0	Flytande	Lösligt	Sensibiliserande (starkt)	Positiv	9–30	4–9
2-mercaptobensotiazol	149-30-4	Fast	Olösligt	Sensibiliserande (måttligt)	Positiv	250–290	60–250
Etylendiamin	107-15-3	Flytande	Lösligt	Sensibiliserande (måttligt)	Positiv	500–700	0,1–0,4
Etylenglykoldimetakrylat	97-90-5	Flytande	Olösligt	Sensibiliserande (svagt)	Positiv	> 2 000	0,04–0,1
4-allylanisol (Estragol)	140-67-0	Flytande	Olösligt	Sensibiliserande (svagt)	Positiv	> 2 000	0,01–0,07
Streptomycinsulfat	3810-74-0	Fast	Lösligt	Ej sensibiliserande	Negativ	> 2 000	> 2 000
Glycerol	56-81-5	Flytande	Lösligt	Ej sensibiliserande	Negativ	> 2 000	> 2 000
Isopropanol	67-63-0	Flytande	Lösligt	Ej sensibiliserande	Negativ	> 2 000	> 2 000

Förkortningar: CAS-nr = nummer i registret som förs av Chemical Abstracts Service.

¹ In vivo-styrkan härleds med användning av de kriterier som föreslagits av ECETOC (19).

² Baserat på historiskt observerade värden (1) (6).

³ CV05 och IL-8 Luc MIT har beräknats med användning av den vattenlöslighet som anges av EPI Suite™.

⁴ CV05: den lägsta koncentration vid vilken kemikalier uppvisar ett Inh-GAPLA-värde som är lägre än 0,05.

⁵ MIT: den lägsta koncentration vid vilken en kemikalie uppfyller kriteriet för positivt resultat.

Tillägg 3.4**INDEX OCH BEDÖMNINGSKRITERIER****nIL8LA (nSLO-LA)**

Den j:te repetitionen ($j = 1-4$) för den i:te koncentrationen ($i = 0-11$) mäts för IL8LA (SLO-LA) respektive GAPLA (SLR-LA). Normaliserad IL8LA, som kallas för nIL8LA (nSLO-LA), definieras enligt följande:

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

Det här är den grundläggande måttenheten i detta test.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Ind-IL8LA, som är den X-faldiga ökningen av det genomsnittliga nIL8LA-värdet (nSLO-LA) för de upprepade mätningarna av den i:te koncentrationen i förhållande till motsvarande värde för nollkoncentrationen, är det primära mätvärdet i detta test. Detta förhållande skrivs med följande formel:

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

Huvudlaboratoriet (laboratoriet som styrde valideringsarbetet) har föreslagit att ett värde på 1,4 ska motsvara ett positivt resultat för den testade kemikalien. Detta värde är baserat på det huvudlaboratoriets undersökning av historiska data. Datahanteringsgruppen har sedan använt detta värde under alla faser av valideringsstudien. Det primära resultatet, Ind-IL8LA, är förhållandet mellan två aritmetiska genomsnitt, vilket visas i formeln.

95-procentigt konfidensintervall (95 % CI)

Det 95-procentiga konfidensintervallet (95 % CI) för det nyss nämnda förhållandet kan uppskattas för att visa exaktheten i det primära resultatmåttet. Den nedre gränsen för 95 % CI ≥ 1 anger att nIL8LA-värdet med den i:te koncentrationen är betydligt högre än motsvarande värde med lösningsmedelskontroll. Det finns flera olika sätt att fastställa det 95-procentiga konfidensintervallet. Vi har använt oss av metoden som kallas Fiellers teorem i den här studien. Detta teorem för det 95-procentiga konfidensintervallet använder sig av följande formel:

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

där

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

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

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

$t_{0.975(v)}$ är den 97,5:e percentilen för den centrala t-fördelningen med frihetsgraden v , där

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

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA är förhållandet mellan det genomsnittliga GAPLA-värdet (SLR-LA) för de upprepade mätningarna av den i:te koncentrationen jämfört med motsvarande värde för lösningsmedelskontrollen, vilket skrivs på följande sätt:

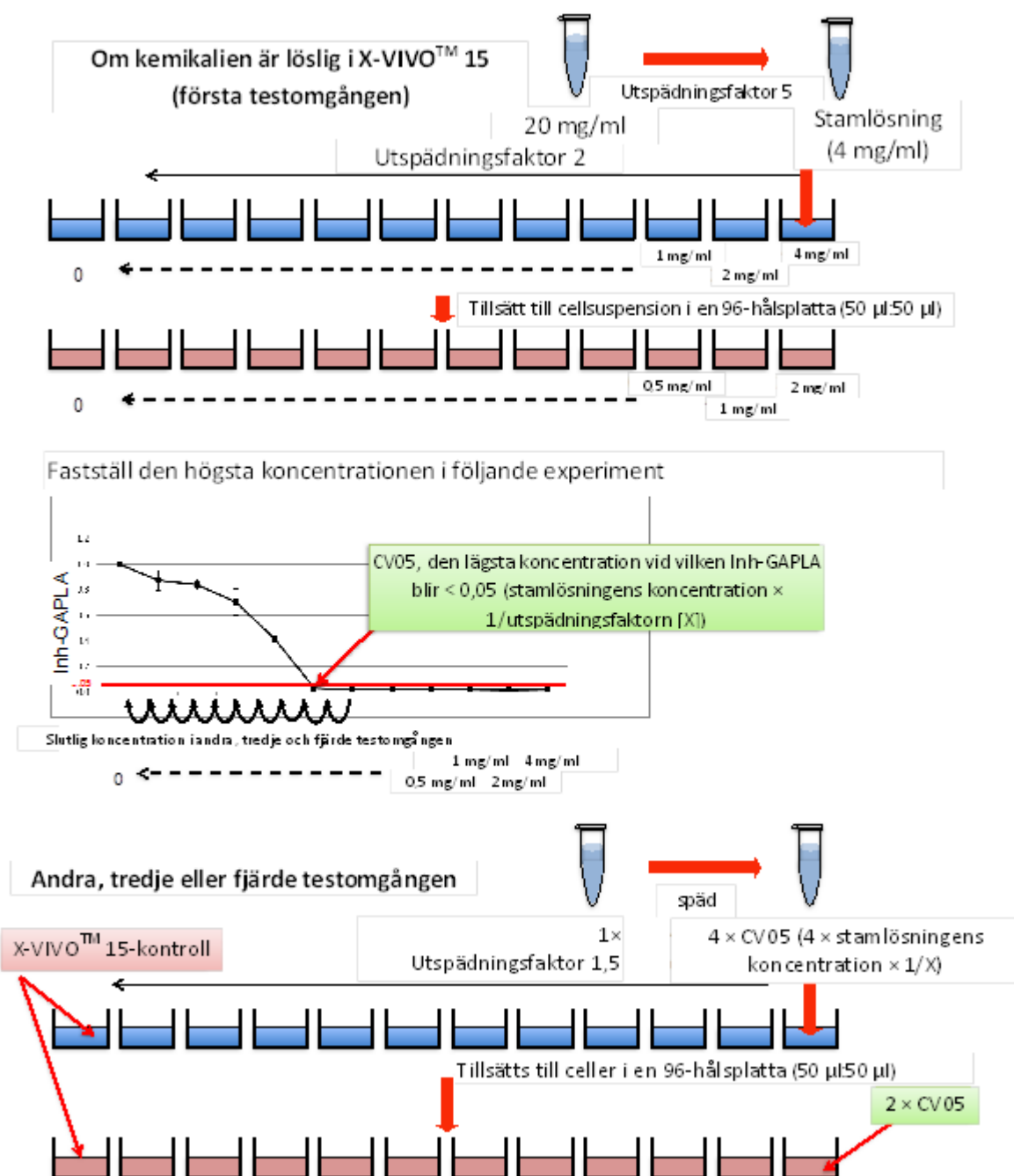
$$Inh - GAPLA_i = \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j}\}.$$

Eftersom GAPLA-värdet är nämnare vid uträkningen av nIL8LA, orsakar ett extremt litet värde en stor variation i nIL8LA-värdet. Av den anledningen kan Ind-IL8LA-värden med ett extremt litet värde för Inh-GAPLA (mindre än 0,05) anses ha en dålig precision.

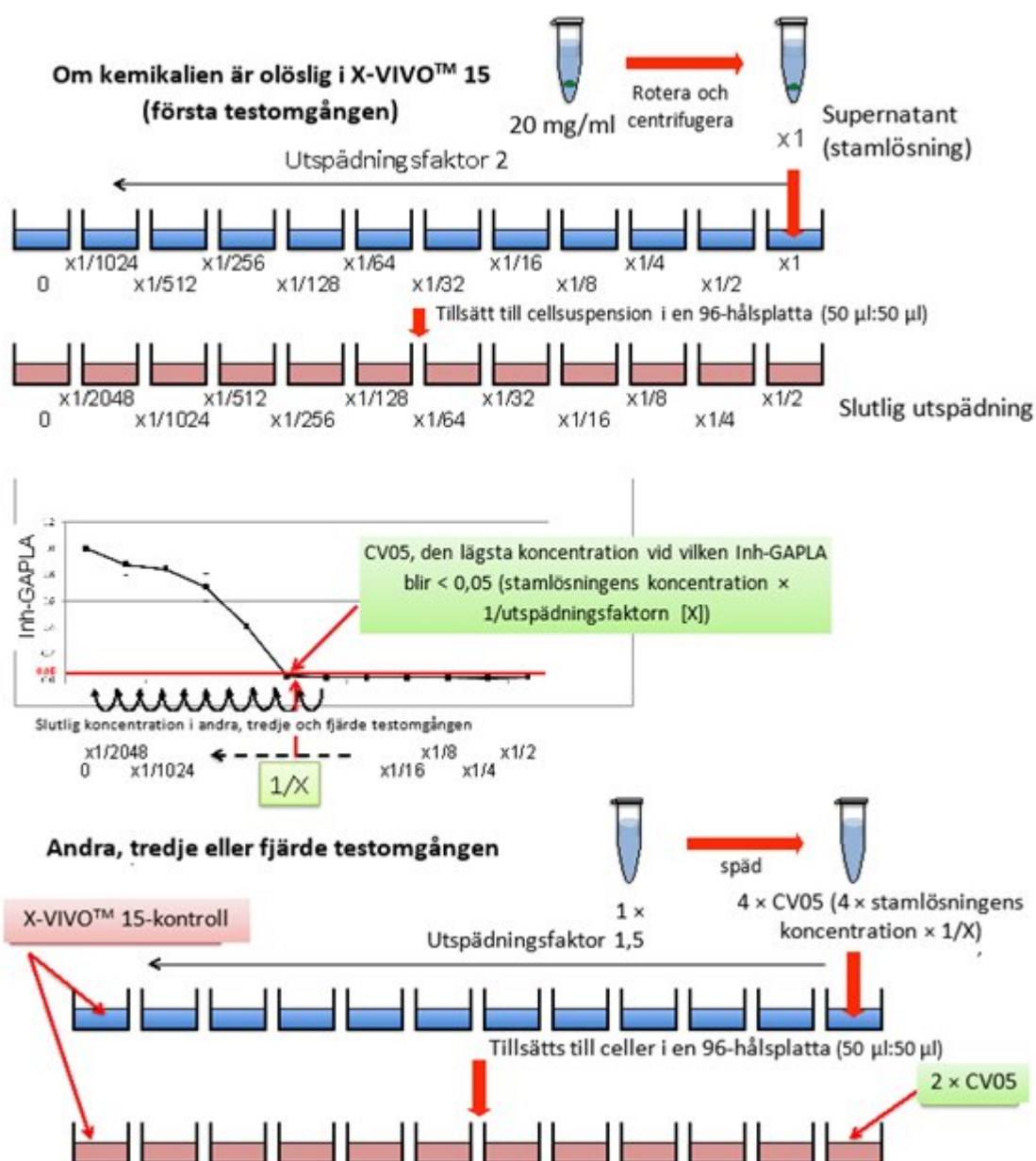
Tillägg 3.5

**SCHEMATISK BESKRIVNING AV DE METODER SOM ANVÄNDS FÖR ATT LÖSA
UPP KEMIKALIER FÖR IL-8 LUC-TESTET**

- a) För kemikalier som är lösliga i X-VIVO™ 15 vid koncentrationen 20 mg/ml

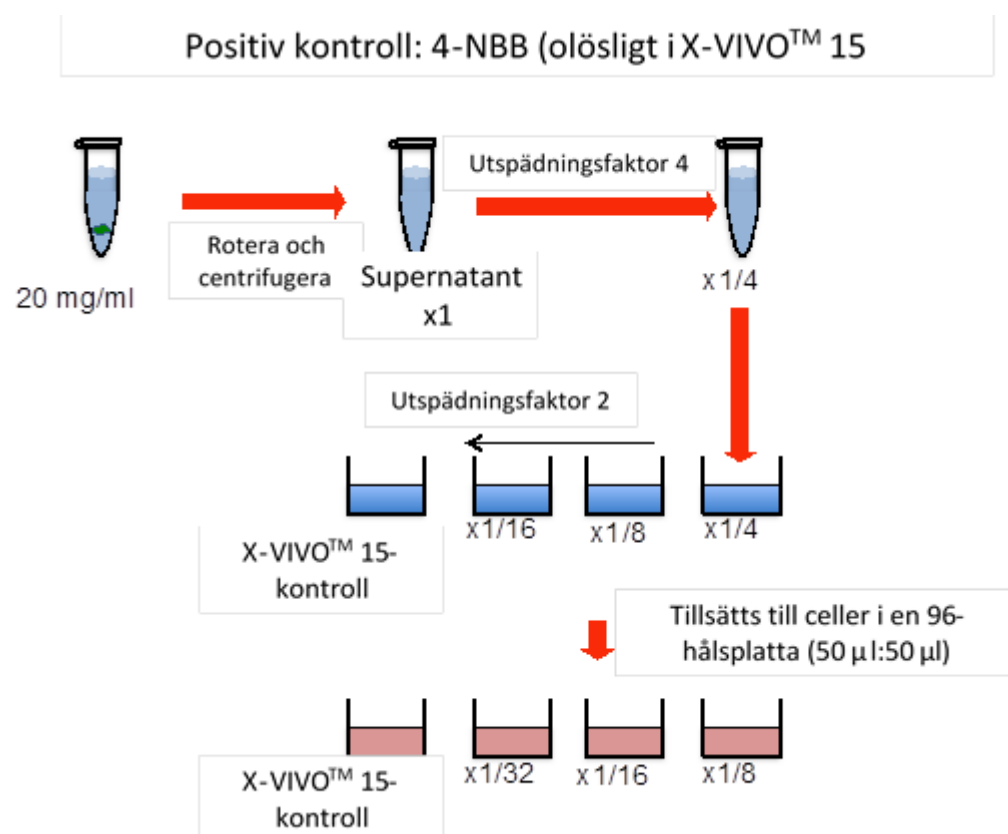


b) För kemikalier som är olösliga i X-VIVO™ 15 vid koncentrationen 20 mg/ml



Tillägg 3.6

SCHEMATISK BESKRIVNING AV DEN METOD SOM ANVÄNDS FÖR ATT LÖSA UPP 4-NBB FÖR IL-8 LUC-TESTETS POSITIVA KONTROLL



”

(9) I del C ska följande kapitel läggas till:

”C.52 UTÖKAD ENGENERATIONSSTUDIE AVSEENDE REPRODUKTION HOS JAPANSK RISFISK

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 240 (2015). Den utökade engenerationsstudien avseende reproduktion hos japansk risfisk (MEOGRT, Medaka Extended One Generation Reproduction Test) är en omfattande testmetod som, baserat på exponering av fisk under flera generationer, tillhandahåller data som är relevanta för bedömning av kemikaliers ekologiska fara och risk, vilket innefattar misstänkta hormonstörande ämnen (EDC-ämnen, Endocrine Disrupting Chemicals). Exponeringen i MEOGRT-testmetoden fortsätter fram till kläckningen (fram till två veckor efter befruktningen [wpf, ”weeks past fertilisation”]) för den andra generationen (F2). Ytterligare undersökningar skulle krävas för att motivera nyttan av att förlänga F2-generationen bortom kläckningen; för närvarande finns det inte tillräckligt med information för att tillhandahålla relevanta förutsättningar eller kriterier som rättfärdigar en förlängning av F2-generationen. Den här testmetoden kan dock komma att uppdateras allteftersom ny information och nya data tas i beaktande. Till exempel skulle riktlinjer gällande förlängning av F2-generationen genom reproduktionsfasen potentiellt kunna vara användbara under vissa förhållanden (exempelvis för kemikalier med hög biokoncentrationspotential eller vid indikationer på generationsöverskridande effekter inom andra taxa). Den här testmetoden kan användas för att bedöma de potentiella kroniska effekterna av kemikalier, vilket innefattar potentiellt hormonstörande kemikalier, på fisk. Metoden lägger tonvikten primärt vid potentiella populationsrelevanta effekter (det vill säga negativ påverkan på överlevnad, utveckling, tillväxt och reproduktion) för beräkning av en nolleffektkoncentration (NOEC, No Observed Effect Concentration) eller en effektiv koncentration (EC_x, Effect Concentration), även om det bör noteras att EC_x-strategier sällan lämpar sig för stora studier av den här typen där en ökning av antalet testkoncentrationer för att möjliggöra ett fastställande av önskat EC_x-värde kan stöta på praktiska problem och även vara tveksamt ur ett djurskyddsperspektiv på grund av det stora antalet djur som behöver användas. För kemikalier som inte kräver bedömning över ”flera generationer” eller kemikalier som inte är potentiellt hormonstörande kan andra testmetoder vara mer lämpliga (1). Den japanska risfisken är den art som lämpar sig att använda för den här testmetoden, med tanke på fiskens korta livscykel och möjligheten att fastställa dess genetiska kön (2), något som räknas som en avgörande komponent i denna testmetod. De specifika metoder och de observerbara endpoints som anges i denna testmetod är endast tillämpliga för den japanska risfisken. Andra små fiskarter (till exempel sebrafisk) kan anpassas till ett liknande testprotokoll.

2. I den här testmetoden mäts flera biologiska endpoints. Tonvikten läggs primärt vid potentiella skadliga effekter gällande populationsrelevanta parametrar, däribland överlevnad, allmän utveckling, tillväxt och reproduktion. För att tillhandahålla mekanistisk information och skapa en koppling mellan resultat från andra typer av fält- och laboratoriestudier, när det finns *a posteriori*-bevis för att en kemikalie har potentiell hormonstörande verkan (till exempel androgen eller östrogen aktivitet i andra tester och försök), kan dock annan användbar information erhållas sekundärt genom mätning av mRNA från *vitellogenin* (*vtg*) (eller vitellogeninprotein, VTG), undersökning av fenotypiska sekundära könskaraktärer (SSC, Secondary Sex Characteristics) i förhållande till det genetiska könet och utvärderande histopatologi. Det bör noteras att om en testkemikalie eller dess metaboliter inte misstänks vara hormonstörande ämnen är det eventuellt inte nödvändigt att mäta dessa sekundära endpoints och mindre resurskrävande och djurintensiva studier kan då vara mer lämpliga (1). Definitioner av begrepp som används i denna testmetod finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

3. Till följd av det begränsade antalet kemikalier som testats och det begränsade antalet laboratorier som varit involverade i valideringen av detta relativt komplicerade test, kan det förväntas att när ett tillräckligt antal studier finns tillgängliga för att det ska gå att utröna effekterna av denna nya testutformning kommer testmetoden att gås igenom och vid behov revideras i ljuset av den vunna erfarenheten. De data som erhålls kan användas för nivå 5 enligt OECD:s ramverk för testning och bedömning av hormonstörande ämnen (OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters) (3). Testmetoden inleds med att vuxen fisk (generation F0) exponeras för testkemikalien under reproduktionsfasen. Exponeringen fortsätter sedan under utvecklings- och reproduktionsfaserna för generation F1 och kläckningen av generation F2; på så sätt möjliggör testet bedömning av såväl strukturella som aktiveringsstyrda endokrina vägar. En sammanvägd bedömning av resultaten kan användas vid tolkningen av endokrinrelaterade endpoints.
4. Testet bör innefatta ett tillräckligt antal individer för att säkerställa att det finns tillfredsställande statistisk säkerhet för bedömningen av reproduktionsrelevanta endpoints (se tillägg 3), samtidigt som antalet använda djur ska vara så litet som möjligt av djurskyddsskäl. Med tanke på det stora antalet försöksdjur som används är det viktigt att noggrant överväga behovet av testet, sett i förhållande till befintliga data som kanske redan innehåller relevant information kring många av MEOGRT-testmetodens endpoints. Viss hjälp i detta hänseende kan erhållas från OECD:s ramverk för testning av toxicitet för fisk (OECD Fish Toxicity Testing Framework) (1).

5. Testmetoden har framför allt tagits fram för att urskilja effekterna av ett enskilt ämne. Om ett test med en blandning ändå krävs, bör det övervägas huruvida testet kommer att ge godtagbara resultat för det avsedda tillsynsändamålet.
6. Innan testet inleds är det viktigt att ha information om testkemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper, framför allt för att möjliggöra framtagningen av stabila kemiska lösningar. Det är även nödvändigt att ha en tillräckligt känslig analytisk metod för att verifiera testkemikaliens koncentrationer.

TESTETS PRINCIP

7. Testet inleds med exponering av köns mogna hanar och honor (minst 12 wpf) i avelspar under tre veckor, varunder testkemikalien distribueras i organismen hos föräldragenerationen (F0) i enlighet med dess toxikokinetiska egenskaper. Så nära den första dagen i den fjärde veckan som möjligt samlas ägg in för att starta F1-generationen. Under uppfödningen av F1-generationen (sammanlagt 15 veckor) bedöms kläckbarheten och överlevnaden. Dessutom tas prover på fiskarna vid 9–10 wpf för endpoint-mätningar gällande utvecklingen, och fiskarnas lek bedöms under tre veckor från 12 till 14 wpf. En F2-generation startas efter den tredje veckan av reproduktionsbedömningen och föds upp till dess att kläckningen är slutförd.

GILTIGHETSKRITERIER FÖR TESTET

8. Följande kriterier ska vara uppfyllda för att testet ska bedömas som giltigt:
 - Koncentrationen upplöst syre ska vara ≥ 60 % av luftmättnadsvärdet under hela testet.
 - Medelvattentemperaturen under hela studien ska ligga mellan 24 och 26 °C. Kortvariga avvikelser från det genomsnittliga värdet i enskilda akvarier ska inte överstiga 2 °C.
 - Den genomsnittliga fekunditeten för kontrollgrupperna i varje generation (F0 och F1) ska vara högre än 20 ägg per par och dygn. Fertiliteten för samtliga ägg som produceras under bedömningen ska vara högre än 80 %. Därtill ska 16 av de rekommenderade 24 avelsparen i kontrollgrupperna (> 65 %) producera fler än 20 ägg per par och dygn.
 - Äggens kläckbarhet ska vara ≥ 80 % (i genomsnitt) i kontrollgrupperna (för var och en av generationerna F1 och F2).
 - Överlevnaden efter kläckning och fram till 3 wpf och från 3 wpf till avslutandet av generation F1 (det vill säga 15 wfp) ska vara ≥ 80 % (genomsnitt) respektive ≥ 90 % (genomsnitt) i kontrollgrupperna (för F1).

- Bevis ska finnas tillgängliga som visar att koncentrationerna av testkemikalien i lösningarna på ett tillfredsställande sätt har hållits inom $\pm 20\%$ av de genomsnittliga uppmätta värdena.

I fråga om vattentemperaturen bör, även om det inte är ett giltighetskriterium för testet, replikat inom en och samma behandling inte statistiskt skilja sig åt och inte heller bör olika behandlingsgrupper inom testet statistiskt skilja sig åt (baserat på dagliga temperaturmätningar och borträknat kortvariga avvikelser).

9. Även om en minskad reproduktion kan observeras i grupperna som utsätts för högst exponering, bör det finnas en tillräcklig reproduktion åtminstone i gruppen med den tredje högsta exponeringen och i samtliga grupper med lägre exponering inom F0 så att inkubatorerna för kläckningen kan fyllas. Därtill bör det finnas en tillräcklig överlevnad hos embryona i gruppen med den tredje högsta exponeringen och i grupperna med lägre exponering inom F1 så att det går att genomföra en endpoint-utvärdering vid provtagningstidpunkten för subadult fisk (se punkterna 36 och 38, samt tillägg 9). Dessutom bör det råda åtminstone en miniminivå av överlevnad efter kläckning ($\sim 20\%$) i gruppen med den näst högst exponeringen inom F1. Det här är inte några giltighetskriterier, utan rekommendationer för att möjliggöra en tillförlitlig beräkning av nolleffektkoncentrationerna.
10. Om en avvikelse från giltighetskriterierna för testet observeras, bör konsekvenserna av detta beaktas i förhållande till testresultatets tillförlitlighet och dessa avvikelser och beaktanden bör tas med i testrapporten.

BESKRIVNING AV METODEN

Utrustning

11. Normal laboratorieutrustning och i synnerhet följande:

- a) Syrgas- och pH-mätare.
- b) Utrustning för att bestämma vattnets hårdhet och alkalinitet.
- c) Lämplig utrustning för temperaturreglering, helst med kontinuerlig övervakning.
- d) Akvarier tillverkade av kemiskt inert material och tillräckligt stora för den rekommenderade fisktätheten och antalstätheten (se tillägg 3),
- e) Lämplig precisionsvåg (med en noggrannhet på $\pm 0,5$ mg).

Vatten

12. Valfritt vatten i vilket testarten uppvisar lämplig överlevnad och tillväxt på lång sikt kan användas som testvatten. Vattnet ska hålla en konstant kvalitet under hela testperioden. För

att säkerställa att spädvattnet inte påverkar testresultaten på oönskat sätt (till exempel genom komplexbildning med testkemikalien) eller har skadlig påverkan på de lekmogna avelsfiskarnas prestationsförmåga, ska vattenprover tas regelbundet för analys. Mätningar av tungmetaller (till exempel Cu, Pb, Zn, Hg, Cd och Ni), viktiga anjoner och katjoner (till exempel Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- och SO_4^{2-}), bekämpningsmedel, totalt organiskt kol och uppslammade fasta substanser bör utföras exempelvis var sjätte månad i fall där man vet att spädvattnet håller en relativt jämn kvalitet. Några kemiska egenskaper för ett godtagbart spädvatten anges i tillägg 2. Vattnets pH-värde ska ligga inom intervallet 6,5–8,5, men får under ett givet test variera med högst $\pm 0,5$ pH-enheter.

Exponeringssystem

13. Utformningen av och de använda materialen i exponeringssystemet specificeras inte. Glas, rostfritt stål eller andra kemiskt inerta material, som inte har kontaminerats under tidigare tester, bör användas vid konstruktionen av testsystemet. För det här testets syften kan ett lämpligt exponeringssystem utgöras av ett system för kontinuerligt genomflöde (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Testlösningar

14. Stamlösningen av testkemikalien ska levereras in i exponeringssystemet med en lämplig pump. Flödeshastigheten för stamlösningen ska kalibreras utifrån en analytisk bekräftelse av testlösningarnas koncentration innan exponeringen påbörjas, samt kontrolleras volumetriskt med jämna mellanrum under testet. Testlösningen i varje kammare förnyas på lämpligt sätt (till exempel med minst 5 volymförnyelser/dygn, till upp till 16 volymförnyelser/dygn, eller genom ett flöde på upp till 20 ml/minut) beroende på testkemikaliens stabilitet och vattnets kvalitet.
15. Testlösningar med de valda koncentrationerna bereds genom utspädning av en stamlösning. Stamlösningen bör helst beredas genom att man helt enkelt blandar eller skakar testkemikalien i spädvattnet på mekanisk väg (till exempel genom omrörning och/eller ultraljudsbehandling). Mättnadskolonner/-system eller passiva doseringsmetoder (14) kan användas för att få en stamlösning med lämplig koncentration. Man bör på alla sätt försöka undvika lösningsmedel eller bärämnen, av följande skäl: 1) vissa lösningsmedel kan i sig själva medföra toxicitet och/eller oönskad eller oväntad respons, 2) testkemikalier i koncentrationer som ligger över kemikaliernas vattenlöslighet (vilket ofta kan vara fallet vid användning av lösningsmedel) kan leda till felaktigt fastställande av effektiva koncentrationer, 3) användning av lösningsmedel i längre tester kan leda till en betydande grad av "biofilm-bildning" kopplad till mikrobiell aktivitet, vilket kan påverka såväl miljöförhållandena som förmågan att upprätthålla korrekta exponeringskoncentrationer, och 4) i avsaknad av historiska data som styrker att lösningsmedlet inte påverkar studiens resultat, krävs vid användning av lösningsmedel en

kontrollgrupp med lösningsmedel vilket får konsekvenser ur ett djurskyddsperspektiv eftersom ytterligare djur krävs för testets utförande. För kemikalier som är svåra att testa kan ett lösningsmedel användas som en sista utväg, och OECD:s vägledande dokument 23 om akvatisk toxicitetstestning av svåra ämnen och blandningar (OECD Guidance Document 23 on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures) (15) bör rådfrågas för att fastställa vilken metod som passar bäst. Valet av lösningsmedel ska avgöras av testkemikaliens kemiska egenskaper och av tillgången till historiska data om användning av lösningsmedlet. Om lösningsmedel används som bärämne bör lämpliga lösningsmedelskontroller bedömas i tillägg till (de negativa) kontrollerna utan lösningsmedel (endast spädvatten). Om det inte går att undvika att använda ett lösningsmedel och mikrobiell aktivitet (bildande av biofilm) uppkommer, rekommenderas det att registrera/rapportera bildandet av biofilm för varje akvarium (åtminstone en gång i veckan) under hela testet. Helst bör lösningsmedelskoncentrationen hållas konstant för lösningsmedelskontrollen (kontrollgruppen med lösningsmedel) och alla testbehandlingar. Om lösningsmedelskoncentrationen inte hålls konstant bör den högsta lösningsmedelskoncentrationen i testbehandlingen användas för lösningsmedelskontrollen. I fall där lösningsmedel används som bärämne bör den maximala lösningsmedelskoncentrationen inte överskrida 100 µl/l eller 100 mg/l (15) och det rekommenderas att lösningsmedelskoncentrationen hålls så låg som möjligt (till exempel < 20 µl/l) för att undvika potentiell påverkan från lösningsmedlet på de uppmätta endpointvärdena (16).

Försöksdjur

Val av fisk och fiskhållning

16. Arten som ska användas för testet är den japanska risfisken *Oryzias latipes*, till följd av dess korta livscykel och möjligheten att fastställa dess genetiska kön. Även om andra små fiskarter kan anpassas till ett liknande testprotokoll, är de specifika metoder och de observerbara endpoints som anges i denna testmetod endast tillämpliga för den japanska risfisken (se punkt 1). Risfisken är lätt att få att föröka sig i fångenskap; det finns publicerade metoder för odling av fisken (17) (18) (19) och det finns även data från tester gällande kortsiktig letalitet, det tidiga levnadsstadiet och den kompletta livscykeln (5) (6) (8) (9) (20). Alla fiskar ska hållas i en miljö med en fotoperiod bestående av 16 timmars ljus och 8 timmars mörker. Fiskarna ska matas med levande naupliuslarver av saltkräfta, *Artemia* spp., som kan kompletteras med ett kommersiellt tillgängligt flingfoder vid behov. Det kommersiellt tillgängliga flingfodret bör regelbundet analyseras med avseende på föroreningar.
17. Så länge lämpliga djurhållningsrutiner följs krävs inget specifikt fiskodlingsprotokoll. Risfiskar kan exempelvis födas upp i 2-litersakvarier med 240 fiskyngel per akvarium fram

till 4 wpf, varefter de föds upp i 2-litersakvarier med 10 fiskar per akvarium fram till 8 wpf, varpå de delas upp i ett avelspar per 2-litersakvarium.

Acklimatisering och urval av fisk

18. Testfiskarna ska väljas ut från en och samma laboratoriestam, som under minst två veckor före testets början har acklimatiserats för testet genom att hållas i vatten med liknande kvalitet och under liknande ljusförhållanden. (Observera: Denna acklimatiseringsperiod är inte en förexponeringsperiod in situ). Det rekommenderas att testfiskarna erhålls från en odling inom laboratoriet, eftersom transport av vuxen fisk är stressande för fisken och kan förhindra ett tillförlitlig lekbeteende. Fiskarna ska matas med naupliuslarver av saltkräfta två gånger om dagen under hela fiskhållningsperioden och under exponeringsfasen, kompletterat med ett kommersiellt tillgängligt flingfoder vid behov. Minst 42 avelspar (54 avelspar om en lösningsmedelskontroll krävs till följd av, bland annat, brist på historiska data som stöder användning av enbart en lösningsmedelskontroll) anses nödvändigt för att starta testet, för att säkerställa en tillräcklig reproduktion. Dessutom ska varje avelspar inom F0-generationen verifieras vara XX-XY (det vill säga ha en normal uppsättning könskromosomer för varje kön) för att undvika eventuell inkludering av spontant uppkomna XX-hanar (se punkt 39).
19. Under acklimatiseringsfasen ska dödsfall bland den odlade fisken registreras och följande kriterier tillämpas efter en stabiliseringsperiod på 48 timmar:
 - Vid dödstal som överstiger 10 % av odlingens population under de sju dagar som föregår överföringen till testsystemet: kassera hela partiet.
 - Vid dödstal på mellan 5 % och 10 % av odlingens population under de sju dagar som föregår överföringen till testsystemet: acklimatisera under ytterligare sju dagar, i tillägg till acklimatiseringsperioden på två veckor; om dödstalet under den extra sjudagarsperioden överstiger 5 % ska hela partiet kasseras.
 - Vid dödstal som understiger 5 % av odlingens population under de sju dagar som föregår överföringen till testsystemet: godkänn partiet.
20. Fiskar ska inte behandlas för sjukdomar under acklimatiseringsperioden på två veckor som föregår testet eller under exponeringsperioden, och om möjligt bör behandling av sjukdomar undvikas helt och hållet. Fiskar med kliniska tecken på sjukdom ska inte användas i studien. Dokumentation bör föras över observationer som görs och eventuella profylaktiska och terapeutiska behandlingar av sjukdomar som sker under odlingsperioden som föregår testet.
21. Exponeringsfasen ska startas med sexuellt dimorfa och genetiskt könsbestämda vuxna fiskar från en laboratorieodling med könsmogna djur, framodlade vid 25 ± 2 °C. Fiskarna

ska ha fastställd fertilitet (det vill säga ha producerat livskraftig avkomma) under veckan innan exponeringen. För hela det fiskbestånd som används i testet bör variationen mellan individernas vikt, baserat på kön, vid testets början hållas inom $\pm 20\%$ av den aritmetiska medelvikten för aktuellt kön. Ett delprov av fiskarna bör vägas före testet för att uppskatta medelvikten. De valda fiskarna ska vara minst 12 wpf och ha en vikt på ≥ 300 mg för honor och ≥ 250 mg för hanar.

TESTETS UTFORMNING

Testkoncentrationer

22. Det rekommenderas att man använder fem kemikaliekoncentrationer plus en kontrollgrupp (eller flera kontrollgrupper). Alla informationskällor ska beaktas vid valet av testkoncentrationernas intervall, däribland kvantitativa struktur-aktivitetssamband (QSARs, Quantitative Structure Activity Relationships), jämförelser med kemiskt analoga ämnen och resultat från tester på fisk, exempelvis test avseende akut toxicitet (kapitel C.1 i denna bilaga), korttidstest av reproduktion hos fisk (kapitel C.48 i denna bilaga) och andra testmetoder, till exempel enligt kapitlen C.15, C.37, C.41, C.47 eller C.49 i denna bilaga (21) (22) (23) (24) (25) (26), om sådana tester finns att tillgå eller, vid behov, från ett preliminärt test för att hitta rätt intervall som möjligen innefattar en reproduktionsfas. Vid behov kan det preliminära testet för att hitta rätt intervall utföras under förhållanden (i fråga om vattenkvalitet, testsystem och djurtäthet) som liknar dem som ska användas vid det slutliga testet. Om ett lösningsmedel måste användas och inga historiska data finns att tillgå, kan det preliminära testet för att hitta rätt intervall användas för att identifiera lösningsmedlets lämplighet. Den högsta testkoncentrationen bör inte överstiga vattenlösligheten, 10 mg/l eller 1/10 av LC50-96 timmar (27). Den lägsta koncentrationen bör vara 10- till 100-tals gånger lägre än den högsta koncentrationen. Användningen av fem koncentrationer i det här testet gör det inte bara möjligt att mäta dos-effektsamband utan ger även värdena LOEC (lägsta koncentration med observerad effekt) och NOEC (nolleffektkoncentration), vilka krävs för riskbedömning enligt vissa regelverk eller i vissa jurisdiktioner. Generellt sett ska avståndsfaktorn mellan nominella koncentrationer av testkemikalien för intilliggande behandlingsnivåer vara $\leq 3,2$.

Replikat inom behandlingsgrupper och kontrollgrupper

23. Minst sex replikat-testkammare ska användas för varje testkoncentration (se tillägg 7). Under reproduktionsfasen (förutom för F0-generationen) fördubblas replikatstrukturen för bedömning av fekunditeten och varje replikat ska endast ha ett enda avelspar (se punkt 42).
24. En kontrollgrupp med spädvatten och, vid behov, en med lösningsmedel bör användas i tillägg till testkoncentrationerna. Ett dubblerat antal replikat-kammare ska användas för kontrollgrupperna för att säkerställa en tillräcklig statistisk säkerhet (det vill säga minst

tolv replikat för kontrollgrupperna). Under reproduktionsfasen fördubblas antalet replikat i kontrollgrupperna (det vill säga minst 24 replikat, och varje replikat ska endast ha ett enda avelspar). Efter reproduktionen ska kontrollgruppernas replikat inte innehålla mer än 20 embryon (fiskar).

FÖRFARANDE

Testets inledning

25. De reproduktivt aktiva vuxna fiskar som ska användas för att starta testets F0-generation väljs ut baserat på två kriterier: ålder (normalt över 12 wpf, men det rekommenderas att åldern inte överstiger 16 wpf) och vikt (bör vara ≥ 300 mg för honor och ≥ 250 mg för hanar).
26. Par bestående av hona-hane som uppfyller ovanstående specifikationer flyttas som individuella par till de olika replikatakvarierna, det vill säga tolv replikat för kontrollgrupper och sex replikat för grupper med kemikaliebehandling vid testets start. Dessa akvarier tilldelas slumpvis en behandling (till exempel T1–T5 och kontroll) och ett replikat (till exempel A–L i kontrollgrupper och A–F i behandlingsgrupper), varefter de placeras i exponeringssystemet med korrekt flöde till varje akvarium.

Exponeringsförhållanden

27. En komplett sammanställning av testparametrarna och testbetingelserna finns i tillägg 3. När dessa specifikationer följs bör resultatet bli kontrollfiskar med endpoint-värden som liknar värdena i tillägg 4.
28. Under testet ska upplöst syre, pH och temperatur mätas i åtminstone ett testkärl för varje behandlingsgrupp och kontrollgruppen. Som minimum ska dessa mätningar, förutom vad gäller temperaturen, göras en gång i veckan under hela exponeringsperioden. Medelvattentemperaturen ska, för hela testet och under hela testets längd, ligga mellan 24 och 26 °C. Temperaturen ska mätas varje dag under hela exponeringsperioden. Vattnets pH-värde ska ligga inom intervallet 6,5–8,5, men får under ett givet test variera med högst $\pm 0,5$ pH-enheter. Replikat inom en och samma behandling bör inte statistiskt skilja sig åt och inte heller bör olika behandlingsgrupper inom testet statistiskt skilja sig åt (baserat på dagliga temperaturmätningar och borträknat kortvariga avvikelser).

Exponeringstid

29. Vid testet exponeras sexuellt reproduktiva fiskar från F0-generationen under tre veckor. I vecka fyra, ungefär på testdag 24, är F1-generationen etablerad och F0-avelsparen avlivas på ett skonsamt sätt varefter deras vikt och längd registreras (se punkt 34). Detta följs av exponering av F1-generationen under ytterligare 14 veckor (sammanlagt 15 veckor för F1-

generationen) och av F2-generationen under två veckor fram till kläckning. Testets totala längd är huvudsakligen 19 veckor (det vill säga fram till dess att F2-generationen kläcks). Tidslinjer för testet visas i tabell 2 och förklaras i närmare detalj i tillägg 9.

Utfodringsprogram

30. Fiskarna kan matas med saltkräfta, *Artemia* spp., (24 timmar gamla naupliuslarver) med fri tillgång (*ad libitum*), kompletterat med ett kommersiellt tillgängligt flingfoder vid behov. Det kommersiellt tillgängliga flingfodret bör regelbundet analyseras med avseende på föroreningar, till exempel klororganiska bekämpningsmedel, polycykliska aromatiska kolväten (PAH:er) och polyklorerade bifenyler (PCB:er). Foder med en förhöjd nivå av endokrint aktiva ämnen (det vill säga fytoöstrogener), som skulle kunna äventyra testresultaten, ska undvikas. Ej konsumerat foder och fekalt material ska avlägsnas från testkärnen vid behov, till exempel genom omsorgsfull rengöring av varje akvariums botten med hjälp av en hävert. Dessutom bör sidorna och botten på varje akvarium rengöras en eller två gånger i veckan (till exempel genom skrapning med en spatel). Ett exempel på ett utfodringschema finns i tillägg 5. Utfodringsmängden är baserad på antalet fiskar per replikat. Därför ska utfodringsmängden minskas om det har inträffat dödsfall i ett replikat.

Analytisk bestämning och mätningar

31. Innan exponeringsperioden påbörjas bör man säkerställa att systemet för kemikalietillsats fungerar på korrekt sätt. Alla analysmetoder som kan komma att behövas ska fastställas, och likaså krävs tillräckliga kunskaper om kemikalins stabilitet i testsystemet. Under testet fastställs koncentrationerna av testkemikalien med lämpliga intervall, helst åtminstone en gång i veckan för ett replikat i varje behandlingsgrupp, med rotering mellan replikaten i samma behandlingsgrupp varje vecka.
32. Under testet bör flödeshastigheterna för spädvattnet och stamlösningen kontrolleras med lämpliga intervall (till exempel minst tre gånger i veckan). Det rekommenderas att resultaten baseras på de uppmätta koncentrationerna. Om koncentrationen av testkemikalien i lösningen på ett tillfredsställande sätt har hållits inom $\pm 20\%$ av de genomsnittliga uppmätta koncentrationerna under hela testet, kan dock resultaten baseras antingen på nominella eller på uppmätta värden. När det rör sig om kemikalier som på ett markant sätt ackumuleras i fiskarna, kan det hända att testkoncentrationerna sjunker i takt med att fiskarna växer. I så fall rekommenderas det att förnyelsetakten för testlösningen i varje kammare anpassas så att testkoncentrationerna kan hållas så konstanta som möjligt.

Observationer och uppmätta endpoints

33. De uppmätta endpoint-värdena innefattar fekunditet, fertilitet, kläckning, tillväxt och överlevnad, för bedömning av möjliga effekter på populationsnivå. Observationer av

fiskarnas beteende bör också göras dagligen och eventuellt onormalt beteende registreras. Till andra mekanistiska endpoint-värden hör leverbaserade nivåer av *vtg*-mRNA eller VTG-protein uppmätta via ett immuntest (28), markörer för fenotypiskt kön, som karakteristiska papillära utväxter på analfenan för hanar, histologisk bedömning av gonadbaserat kön och histopatologisk bedömning av njurar, lever och gonader (se endpoint-förteckningen i tabell 1). Alla dessa specifika endpoint-värden utvärderas mot bakgrund av ett fastställande av individens genetiska kön, som baseras på närvaron eller frånvaron av den japanska risfiskens könsbestämmande gen för hanar, *dmy* (se punkt 41). Dessutom utvärderas tiden till lek. Därtill kan enkla fenotypbaserade könsfördelningar tas fram med användning av information från räkning av antalet papillära utväxter på analfenan, som görs för att definiera enskilda japanska risfiskar som fenotypiska hanar eller honor. Denna testmetod kan inte förväntas detektera små avvikelser från den förväntade könsfördelningen, eftersom det relativt lilla antalet fiskar per replikat inte ger en tillräcklig statistisk säkerhet. Dessutom utvärderas, i samband med den histopatologiska bedömningen, gonaderna och en mycket mer noggrann analys för bedömning av den gonadbaserade fenotypen mot bakgrund av det genetiska könet genomförs.

34. Det primära syftet med den här testmetoden är att bedöma de potentiella populationsrelevanta effekterna av en testkemikalie. Mekanistiska endpoints (VTG, sekundära könskaraktärer och vissa histopatologiska effekter gällande gonaderna) kan också vara till hjälp för att fastställa huruvida någon effekt medieras via en hormonell verkningsmekanism. Dessa mekanistiska endpoints kan dock även påverkas av systemisk toxicitet och annan toxicitet. Därför kan en noggrann histopatologisk undersökning av lever och njurar också utföras, för att man ska få en bättre förståelse av eventuella reaktioner inom mekanistiska endpoint-värden. Om sådana detaljerade undersökningar inte utförs, bör ändå omfattande avvikelser som observeras i samband med arbetet med den histopatologiska bedömningen registreras och rapporteras.

Skonsam avlivning av fisk

35. Vid slutet av exponeringen av generationerna F0 och F1, när delprov ska göras på subadult fisk, ska fiskarna avlivas med lämpliga mängder bedövningslösning (till exempel trikainmetansulfonat, MS-222 [CAS-nr 886-86-2], 100–500 mg/l) som buffrats med 300 mg/l NaHCO₃ (natriumvätekarbonat, CAS-nr 144-55-8) för att minska irritationen av slemhinnorna. Om fiskar visar tecken på avsevärt lidande (på en mycket allvarlig nivå där fiskens död kan förutsägas med tillförlitlighet) och kan betraktas som döende, ska djuren bedövas och avlivas och behandlas som dödsfall vid dataanalysen. När en fisk avlivas på grund av sjukdom ska detta registreras och rapporteras. Beroende på när fisken avlivas under studien, kan fisken bevaras för histopatologisk analys (fisken fixeras för eventuell histopatologisk undersökning).

Hantering av ägg och yngel

Insamling av ägg från avelspar för att föda upp nästa generation

36. Insamling av ägg görs på första dagen (eller de två första dagarna, vid behov) i testvecka 4, för att gå från F0 till F1, och i testvecka 18, för att gå från F1 till F2. Testvecka 18 motsvarar 15 wpf för generation F1, det vill vuxen fisk. Det är viktigt att samtliga ägg avlägsnas från alla akvarier dagen innan ägginsamlingen påbörjas, så att det säkerställs att alla ägg som samlas in från ett avelspar kommer från samma lektillfälle. Efter leken bär risfiskhonorna ibland sina ägg nära anus/genitalöppningen till dess att äggen kan placeras på ett lämpligt substrat. Om det inte finns något lämpligt substrat i akvariet, kan äggen antingen hittas fästa på honan eller på akvariets botten. Beroende på deras placering ska äggen antingen försiktigt avlägsnas från honan eller sugas upp från akvariets botten i testvecka 4 för F0 och testvecka 18 för F1. Alla ägg som samlas in inom en och samma behandling samlas i en gemensam pool innan de fördelas till inkubationskammarna.
37. Äggfilament, som håller samman de lagda äggen, ska avlägsnas. Befruktade ägg (upp till 20 stycken) samlas in från varje avelspar (ett par per replikat), samlas i en gemensam pool för varje behandling och fördelas systematiskt till lämpliga inkubationskammare (se tillägg 6 och 7). Med ett dissektionsmikroskop av god kvalitet kan man se tecken på tidig befruktning/utveckling, till exempel resningen av den yttre fosterhinnan (korion), pågående celldelning eller bildandet av blastulan. Inkubationskammarna kan placeras i separata ”inkubationsakvarier” som har iordningställts för varje behandling (varvid vattenkvalitetsparametrarna och testkemikaliekoncentrationerna måste mätas för dessa) eller i replikatakvariet där de kläckta ynglen (t.ex. gulesäcksyngel) senare ska hållas. Om en andra insamlingsdag (testdag 23) behövs, ska alla ägg från båda dagarna läggas samman i en gemensam pool och därefter systematiskt fördelas till de olika behandlingsreplikaten.

Uppfödning av ägg fram till kläckning

38. Befruktade ägg hålls hela tiden i rörelse, till exempel inom ägginkubatorn med hjälp av luftbubblor eller genom vertikal svängning av hela ägginkubatorn. Eventuella dödsfall bland befruktade ägg (embryon) kontrolleras och registreras dagligen. Döda ägg avlägsnas från inkubatorerna (se tillägg 9). På det sjunde dygnet efter befruktningen (dpf, ”day post fertilisation”) avbryts eller minskas rörelsen, så att de befruktade äggen kommer till ro på inkubatorns botten. Detta främjar kläckningen, som normalt sker under de kommande ett till två dygnen. Fiskynglen (unga fisklarver, gulesäcksyngel) räknas för varje behandling och kontrollgrupp (utifrån replikatens samlade pool). Befruktade ägg som inte har kläckts när det har gått dubbelt så lång tid som mediandagen för kläckning i kontrollgruppen (normalt 16 eller 18 dpf) räknas som ej levnadsdugliga och kasseras.

39. Tolv yngel överförs till varje replikatakvarium. Ynglen från inkubationskamrarna samlas i en gemensam pool och fördelas sedan systematiskt till replikatakvarierna (se tillägg 7). Detta kan åstadkommas genom att yngel slumpvis väljs ut från behandlingens gemensamma pool och därefter, med slumpens hjälp, i tur och ordning placeras i replikatakvarier. Varje akvarium ska innehålla ett lika stort antal ($n = 12$) av de kläckta ynglen (maximalt 20 embryon per akvarium). Om det inte finns tillräckligt med yngel för att fylla alla behandlingsreplikat, rekommenderas det att säkerställa att så många replikat som möjligt har 12 yngel. Ynglen kan hanteras på ett säkert sätt med hjälp av glaspipetter med stor diameter. Eventuella överblivna yngel avlivs på ett skonsamt sätt med bedövningsmedel. Under de få veckor som föregår bildandet av avelspar, ska dagen då det första lektillfället observeras i varje replikat registreras.

Bildande av avelspar

Fenklippning och fastställande av genotypiskt kön

40. Fastställandet av genotypiskt kön med hjälp av fenklippning görs vid 9–10 wpf (det vill säga testvecka 12–13 för F1-generationen). All fisk inom ett akvarium bedövas (med användning av godkända metoder, till exempel enligt IACUC) och ett litet vävnadsprov tas från stjärtfenans spets, antingen på ryggsidan eller på buksidan, på varje fisk för att fastställa individens genotypiska kön (29). Fiskarna från ett replikat kan hållas i små burar, om möjligt en fisk per bur, i replikatakvariet. Alternativt kan två fiskar hållas i varje bur om de går att skilja från varandra. En metod är att klippa stjärtfenan på olika sätt (till exempel på ryggsidans respektive på buksidans spets) när vävnadsprovet tas.
41. Det genotypiska könet för japanska risfiskar fastställs med hjälp av en identifierad och sekvenserad gen (*dmy*) som sitter på Y-kromosomen. Förekomst av *dmy* visar att det är en XY-individ, oavsett individens fenotyp, medan avsaknad av *dmy* visar att det är en XX-individ, oavsett individens fenotyp (30), (31). Deoxiribonukleinsyra (DNA) från varje fenprov extraheras och förekomsten eller frånvaron av *dmy* kan sedan fastställas med hjälp av PCR-metoder (polymeraskedjereaktion) (se tillägg 9 till kapitel C.41 i denna bilaga eller tillägg 3 och 4 till [29]).

Sammansättning av avelspar

42. Informationen om genotypiskt kön används för att sätta samman XX-XY-avelspar, utan hänsyn till externa fenotyper som kan förändras genom exponeringen för en testkemikalie. På dagen efter det att det genotypiska könet för varje fisk har fastställts, väljs två XX-fiskar och två XY-fiskar slumpvis ut från varje replikat och två XX-XY-avelspar bildas. Om ett replikat saknar antingen två XX- eller två XY-fiskar, ska lämpliga fiskar erhållas från andra replikat inom samma behandling. Prioriteringen är att ha det rekommenderade antalet replikatavelspar för varje behandling (12) och för kontrollgrupperna (24). Fiskar

med uppenbara missbildningar eller avvikelser (problem med simblåsan, deformerad ryggrad, extrema storleksvariationer etc.) ska uteslutas när avelsparen sätts samman. Under den reproduktiva fasen för F1-generationen ska varje replikatakvarium endast innehålla ett enda avelspar.

Provtagning på subadult fisk och endpoint-bedömning

Provtagning på fiskar som inte ingår i avelspar

43. När avelsparen har bildats ska de fiskar som inte valts ut för fortsatt avel avlivas på ett skonsamt sätt för mätning av endpoint-värden för subadult fisk i testvecka 12–13 (F1). Det är extremt viktigt att fiskarna hanteras på ett sådant sätt att det genotypiska könet som fastställdes inför urvalet av avelspar fortfarande kan spåras till varje enskild fisk. Alla data som samlas in analyseras mot bakgrund av det genotypiska könet för den specifika fisken. Varje fisk används för en rad olika endpoint-mätningar, däribland följande: fastställande av överlevnadstal för juvenil/subadult fisk (testveckorna 7–12/13 [F1]), tillväxt med avseende på längd (standardlängden kan mätas om stjärtfenan har förkortats till följd av provtagning för analys av genetiskt kön; den totala längden kan mätas om endast en del av stjärtfenan, på rygg- eller buksidan, har klippts bort för undersökning av *dmy*) och kroppsvikt (det vill säga våtvikt för avtorkad fisk), leverbaserade nivåer av *vtg*-mRNA (eller VTG) och papillära utväxter på analfenan (se tabellerna 1 och 2). Observera att avelsparens vikter och längder också behövs för att det ska gå att beräkna medeltillväxten inom en behandlingsgrupp.

Tagning av vävnadsprov och mätning av vitellogenin

44. Levern dissekeras och ska förvaras vid ≤ -70 °C tills det är dags att mäta nivån av *vtg*-mRNA (eller VTG). Fiskens stjärt, inklusive analfenan, konserveras med ett lämpligt fixativ (till exempel Davidsons fixativ) eller fotograferas, så att analfenans papillära utväxter kan räknas vid en senare tidpunkt. Om så önskas kan prov tas från andra vävnader (till exempel från gonaderna) och konserveras vid denna tidpunkt. Den leverbaserade VTG-koncentrationen ska kvantifieras med en motsvarande ELISA-teknik (se de rekommenderade förfarandena för risfiskar i tillägg 6 till kapitel C.48 i denna bilaga). Som ett alternativ har metoder för kvantifiering av *vtg*-mRNA, det vill säga mRNA-extraktion av *vtg* *I*-genen från ett leverprov och kvantifiering av antalet kopior av *vtg* *I*-genen (per ng totalt mRNA) genom kvantitativ PCR-teknik, tagits fram av Förenta staternas miljöförvaltningsmyndighet (29). I stället för att fastställa antalet kopior av *vtg*-genen i kontroll- och behandlingsgrupperna, är en mer resursvänlig och tekniskt mindre svår metod att fastställa den relativa (X-faldiga) förändringen av *vtg* *I*-uttrycket utifrån kontroll- och behandlingsgrupperna.

Sekundära könskaraktärer

45. Under normala förhållanden har endast könsmogna risfiskhanar papillära utväxter, som utvecklas på ledplattorna för vissa fenestrålar på analfenan som en sekundär könsskaraktär, vilket ger en potentiell biomarkör för hormonstörande effekter. Metoden för att räkna papillära utväxter på analfenan (antalet ledplattor med papillära utväxter) anges i tillägg 8. Dessutom används antalet papillära utväxter på analfenan per individ för att kategorisera individen som en externt fenotypisk hane eller hona, i syfte att beräkna en enkel könsfördelning per replikat. En risfisk med ett antal som överstiger noll definieras som en hane; en risfisk med noll papillära utväxter på analfenan definieras som en hona.

Fekunditets- och fertilitetsbedömning

46. Fekunditeten och fertiliteten bedöms under testveckorna 1–3 för F0-generationen och testveckorna 15–17 för F1-generationen. Ägg samlas dagligen in från varje avelspar under 21 på varandra följande dygn. Äggen tas försiktigt loss från honor som fångas in med håv och/eller suggs upp från akvariets botten varje morgon. Både fekunditeten och fertiliteten registreras dagligen för varje replikatavelspar. Fekunditeten definieras som antalet lagda ägg, och fertiliteten definieras funktionellt som antalet befruktade och livskraftiga ägg vid tidpunkten för räknandet. Räknandet bör utföras så fort som möjligt efter insamlingen av äggen.
47. Replikatets fekunditet registreras dagligen som antalet ägg per avelspar, vilket analyseras genom de rekommenderade statistiska metoderna med användning av replikatmedelvärden. Replikatets fertilitet är antalet befruktade ägg som produceras av ett avelspar dividerat med det totala antalet ägg som produceras av detta par. Statistiskt sett analyseras fertilitet som en kvot per replikat. Replikatets kläckbarhet är antalet kläckta yngel dividerat med antalet använda embryon (normalt 20). Statistiskt sett analyseras kläckbarhet som en kvot per replikat.

Provtagning på vuxna fiskar och endpoint-bedömning

Provtagning på fiskar som ingår i avelspar

48. Efter testvecka 17 (det vill säga efter att F2-generationen har etablerats ordentligt) avlivas de vuxna fiskarna i F1-generationen på ett skonsamt sätt och olika endpoint-värden bedöms (se tabellerna 1 och 2). En bild tas av analfenan för bedömning av papillära utväxter på analfenan (se tillägg 8), och/eller så avlägsnas stjärten, precis bakom anus/genitalöppningen, och fixeras för senare räkning av de papillära utväxterna. En del av stjärtfenan kan tas som prov och arkiveras vid denna tidpunkt, om så önskas, för verifiering av det genetiska könet (*dmy*). Vid behov kan sedan ett vävnadsprov tas för att upprepa *dmy*-analysen, i syfte att verifiera det genetiska könet för specifika fiskar. Kroppshålan öppnas för att möjliggöra perfusion med lämpligt fixativ (till exempel

Davidsons fixativ) innan hela kroppen sänks ned i fixativet. Om en lämplig åtgärd för att öka permeabiliteten utförs före fixeringen, behöver dock inte kroppshålan öppnas.

Histopatologi

49. Varje fisk bedöms histologiskt med avseende på patologi i gonadvävnaden (30) (29). Som nämns i punkt 33 kan andra mekanistiska endpoints som bedöms i detta test (det vill säga VTG, sekundära könskaraktärer och vissa histopatologiska effekter gällande gonaderna) påverkas av systemisk toxicitet eller annan toxicitet. Därför kan en noggrann histopatologisk undersökning av lever och njurar också utföras, för att man ska få en bättre förståelse av eventuella reaktioner inom mekanistiska endpoint-värden. Om sådana detaljerade undersökningar inte utförs, bör ändå omfattande avvikelser som observeras i samband med arbetet med den histopatologiska bedömningen registreras och rapporteras. Det kan vara en idé att börja studera behandlingsgruppen med den högsta koncentrationen (jämfört med kontrollgruppen) och sedan "arbeta sig ned" till en behandling utan effekt, men det rekommenderas dock att man rådfrågar den histopatologiska vägledningen (29). Normalt ska alla prover behandlas/snittas varefter de studeras av patologen. Om ett sådant arbetssätt där man "arbetar sig ned" används, kan det noteras att RSCABS-metoden (Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices) utgår från en förväntan att när dosnivåerna ökar kommer även den biologiska påverkan (patologin) att öka. Som en följd av detta förlorar man en del av den statistiska säkerheten om man bara tittar på en enstaka hög dos utan några mellanliggande doser. Om statistisk analys inte behövs för att fastställa att den höga dosen inte har någon effekt, kan detta arbetssätt vara godtagbart. Den gonadbaserade fenotypen fastställs också genom denna bedömning.

Andra iakttagelser

50. MEOGRT-testet tillhandahåller data som kan användas (till exempel i en sammanvägd bedömning) för att samtidigt utvärdera åtminstone två generella typer av AOP:er (Adverse Outcome Pathways) som resulterar i försämrad reproduktion: a) endokrint medierade vägar, vilket innefattar störning av den endokrina HPG-axeln (hypotalamus-hypofys-gonad), och b) vägar som orsakar minskad överlevnad, tillväxt (längd och vikt) och reproduktion genom icke-endokrint medierad toxicitet. Endpoints som normalt mäts i tester avseende kronisk toxicitet, som test av den kompletta livscykeln och test av det tidiga levnadsstadiet, ingår också i detta test och kan användas för att bedöma faror som utgörs av såväl icke-endokrint medierade toxiska verkningsmekanismer som endokrint medierade toxicitetsvägar. Under testet bör observationer av fiskarnas beteende göras dagligen och eventuellt onormalt beteende registreras. Dessutom bör eventuella dödsfall registreras och överlevnaden fram till gallringen (testvecka 6/7), överlevnaden efter gallringen och fram till provtagningen på subadult fisk (9–10 wpf) och överlevnaden från bildandet av avelspar och fram till provtagningen på vuxen fisk beräknas.

Tabell 1: Endpoint-översikt för MEOGRT-testet*

Levnadsstadium	Endpoint	Generation
Embryo (2 wpf)	Kläckning (i procent och tid till kläckning)	F1, F2
Juvenil fisk (4 wpf)	Överlevnad	F1
Subadult (9 eller 10 wpf)	Överlevnad	F1
	Tillväxt (längd och vikt)	
	Vitellogenin (mRNA eller protein)	
	Sekundära könskaraktärer (papillära utväxter på analfenan)	
	Extern könsfördelning	
	Tid till första lektillfälle	
Vuxen (12–14 wpf)	Reproduktion (fekunditet och fertilitet)	F0, F1
Vuxen (15 wpf)	Överlevnad	F1
	Tillväxt (längd och vikt)	
	Sekundära könskaraktärer (papillära utväxter på analfenan)	
	Histopatologi (gonader, lever, njurar)	

* Dessa endpoints ska analyseras statistiskt.

TIDSLINJE

51. En tidslinje för MEOGRT-testet som visar testets uppbyggnad finns i tabell 2. MEOGRT-testet innefattar 4 veckors exponering av vuxna fiskar i F0-generationen och 15 veckors exponering av F1-generationen, samt en exponeringsperiod för den andra generationen (F2) fram till kläckning (2 wpf). Aktiviteterna under MEOGRT-testets hela förlopp sammanfattas i tillägg 9.

Tabell 2: Tidslinje för exponering och endpoint-mätning för MEOGRT-testet

MEOGRT – tidslinje för exponering och endpoint-mätning																								
F0	1	2	3	4																				
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15						
F2																		1	2					
Testvecka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19					
Levnadsstadier					Embryo					Yngel					Juvenil fisk					Subadult fisk			Vuxen fisk	
Endpoints																								
Fekunditet	F0														F1					I testet används sju grupper med replikat: - Fem för testkemikaliebehandling - Två för kontrollbehandling (fyra om lösningsmedel används) Varje grupp består av: - Tolv replikat för reproduktion och för patologi och SSC för vuxen fisk (v 10–18) - Sex replikat för kläckning, överlevnad och vtg, samt för SSC och tillväxt för subadult fisk (v 1–9) SSC: sekundära könskaraktärer, v: veckor, vtg: vitellogenin				
Fertilitet	F0														F1									
Kläckning					F1														F2					
Överlevnad						F1						F1						F1						
Tillväxt				F0								F1						F1						
Vitellogenin												F1												
Sekundära könskaraktärer												F1						F1						
Histopatologi																		F1						
Testvecka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19					

RAPPORTERING AV UPPGIFTER

Statistisk analys

52. Eftersom genotypiskt kön fastställs för alla fiskar i testet, ska data analyseras separat för varje genotypiskt kön (det vill säga XY-hanar och XX-honor). Om detta inte görs minskar analysens statistiska säkerhet avsevärt. Statistiska analyser av data bör helst följa de förfaranden som beskrivs i OECD-dokumentet *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (32). I tillägg 10 finns ytterligare vägledning gällande den statistiska analysen.

53. Testets utformning och urvalet av statistiska tester bör ge en tillräcklig statistisk säkerhet för att förändringar av biologisk betydelse i endpoint-värdena ska kunna detekteras när en nolleffekt-koncentration (NOEC) ska rapporteras (32). Rapporteringen av relevanta effektiva koncentrationer och parametrar kan vara beroende av regelverket. Den procentuella förändringen för varje endpoint som det är viktigt att upptäcka eller bedöma ska identifieras. Försöket bör utformas för att möjliggöra en sådan identifiering. Samma procentuella förändring gäller sannolikt inte för alla endpoints, och det är inte heller troligt

att man kan utforma ett test som uppfyller ovannämnda kriterier för alla endpoints, så det är viktigt att fokusera på de endpoints som är betydelsefulla för varje test för att kunna utforma testet på lämpligt sätt. Ett statistiskt flödesdiagram och en vägledning finns i tillägg 10 för att underlätta databehandlingen och valet av det mest lämpade statistiska testet eller den mest lämpade statistiska modellen att använda. Andra statistiska metoder kan användas under förutsättning att de är vetenskapligt motiverade.

54. Det är nödvändigt att analysera variationerna inom varje replikatgrupp med hjälp av variansanalys eller kontingenstabellprocedurer, och tillräckliga och lämpliga statistiska analysmetoder ska användas baserat på denna analys. För multipla jämförelser mellan resultaten vid de enskilda koncentrationerna och resultaten för kontrollgrupperna rekommenderas ett step-down-test (till exempel ett Jonckheere-Terpstra-test) för kontinuerlig respons. Om uppgifterna inte överensstämmer med en monoton koncentrationsrespons ska Dunnetts test eller Dunns test användas (efter en lämplig dataomvandling, om detta behövs).
55. I fråga om fekunditeten ska äggen räknas varje dag, men analysen kan göras baserat på det totala antalet ägg eller som en upprepade mätning. I tillägg 10 finns en närmare beskrivning av hur denna endpoint ska analyseras. För histopatologiska data som är i form av allvarlighetsgrader har ett nytt statistiskt test, RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices), utvecklats (33).
56. Endpoints observerade för grupper med kemikaliebehandling som avsevärt avviker från motsvarande värden för kontrollgrupperna ska redovisas.

Överväganden för dataanalys

Användning av ogiltiga behandlingsnivåer

57. Flera faktorer ska beaktas när man fastställer huruvida ett replikat eller en hel behandling uppvisar uppenbar toxicitet och bör avlägsnas från analysen. Uppenbar toxicitet definieras som > 4 dödsfall i ett replikat mellan 3 wpf och 9 wpf som inte kan förklaras av ett tekniskt fel. Andra tecken på uppenbar toxicitet är exempelvis blödning, onormala beteenden, onormala simmönster, anorexi och andra kliniska tecken på sjukdom. För subletala tecken på toxicitet kan det vara nödvändigt att göra kvalitativa bedömningar, och dessa bör alltid göras i jämförelse med kontrollgruppen med spädvatten (endast rent vatten). Om uppenbar toxicitet förekommer i behandlingsgruppen eller behandlingsgrupperna med högst koncentration, rekommenderas det att denna behandlingsgrupp eller dessa behandlingsgrupper utesluts från analysen.

Kontrollgrupper med lösningsmedel

58. Användning av lösningsmedel bör endast ses som en sista utväg, när alla andra alternativ för kemikalietillsats har övervägts. Om ett lösningsmedel används ska man samtidigt ha en kontrollgrupp med spädvatten. I slutet av testet ska en utvärdering göras av lösningsmedlets eventuella effekter. Detta görs genom en statistisk jämförelse mellan kontrollgruppen med lösningsmedel och kontrollgruppen med spädvatten. De endpoints som är mest relevanta att beakta i denna analys är de som gäller tillväxt (vikt), eftersom dessa kan påverkas av en generell toxicitet. Om statistiskt signifikanta skillnader kan påvisas mellan kontrollgruppen med spädvatten och kontrollgruppen med lösningsmedel för dessa endpoints, ska bästa professionella bedömning användas för att fastställa om testets giltighet har äventyrats. Om de båda kontrollgrupperna skiljer sig åt bör behandlingarna med kemikalieexponering jämföras med kontrollgruppen med lösningsmedel, såvida det inte är väl känt att jämförelse med kontrollgruppen med spädvatten är att föredra. Om det inte finns några statistiskt signifikanta skillnader mellan de båda kontrollgrupperna rekommenderas det att behandlingarna med kemikalieexponering jämförs med kontrollgrupperna som helhet (både kontrollgruppen med lösningsmedel och kontrollgruppen med spädvatten), såvida det inte är väl känt att jämförelse med antingen enbart kontrollgruppen med spädvatten eller enbart kontrollgruppen med lösningsmedel är att föredra.

Testrapport

59. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie: fysikaliskt tillstånd och, när så är relevant, fysikalisk-kemiska egenskaper:

- Uppgifter för kemisk identifiering.

Monokomponentämne:

- Fysiskt utseende, vattenlöslighet och andra relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.
- Kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt (inklusive halten organiskt kol i förekommande fall).

Multikomponentämne, UVCB-ämnen och blandningar:

- Karakteriseras så långt det är möjligt genom kemisk identitet (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.

Art som används för testet:

- Vetenskapligt namn, stam (om denna information är tillgänglig), härkomst samt metod för insamling av befruktade ägg och efterföljande hantering.

Testbetingelser:

- Fotoperiod/-perioder.
- Testets utformning (till exempel testkamrarnas storlek, material och vattenvolym, antalet testkammare och replikat och antalet yngel per replikat).
- Metod för beredning av stamlösningar och förnyelsefrekvensen (i förekommande fall bör även solubiliseringsmedlet och dess koncentration anges).
- Metod för dosering av testkemikalien (till exempel pumpar och spädningssystem).
- Metodens återvinningseffektivitet och de nominella testkoncentrationerna, kvantifieringsgränsen, de uppmätta värdenas medelvärden och deras standardavvikelser i testkärnen, samt den metod med vilken dessa erhöles och bevis för att mätningarna hänförs sig till testkemikaliens koncentrationer i en äkta lösning.
- Spädvattnets egenskaper: pH-värde, hårdhet, temperatur, upplöst syre, restklornivåer (om de har uppmätts), totalt organiskt kol (om det har uppmätts), uppslammade partiklar (om det har uppmätts), testmediets salinitet (om den har uppmätts) och resultatet av eventuella övriga mätningar.
- De nominella testkoncentrationerna, de uppmätta värdenas medelvärden och deras standardavvikelser.
- Vattenkvaliteten i testkärnen, pH-värde, temperatur (daglig mätning) och upplöst syre.
- Detaljerade uppgifter om utfodringen (till exempel typ av foder, källa, hur stor mängd som getts och hur ofta).

Resultat:

- Belägg för att kontrollgrupperna uppfyller de allmänna giltighetskriterierna.
- Data för kontrollgruppen (plus kontrollgruppen med lösningsmedel om sådan används) och behandlingsgrupperna, enligt följande: kläckning (kläckbarhet och tid till kläckning) för F1 och F2, överlevnad efter kläckning för F1, tillväxt (längd och kroppsvikt) för F1, genotypiskt kön och könsdifferentiering (till exempel sekundära könskaraktärer som baseras på papillära utväxter på analfenan och histologisk undersökning av gonaderna) för F1, fenotypiskt kön för F1, sekundära könskaraktärer (papillära utväxter på analfenan) för F1, *vtg*-mRNA (eller VTG-protein) för F1, histopatologisk bedömning (gonader, lever och njurar) för F1 och reproduktion (fekunditet och fertilitet) för F0 och F1 (se tabellerna 1 och 2).
- Använd metod för den statistiska analysen (regressionsanalys eller variansanalys) och databehandlingen (använda statistiska tester och modeller).
- Nolleffektkoncentrationen (NOEC) för varje bedömd respons.

- Lägsta koncentration med observerad effekt (LOEC) för varje bedömd respons (vid $p = 0,05$), ECx för varje bedömd respons, i förekommande fall, samt konfidensintervallen (till exempel 90 % eller 95 %) och en kurva för den anpassade modell som använts för att beräkna värdet, lutningen för koncentration-respons-kurvan, formeln för regressionsmodellen och de uppskattade modellparametrarna och deras standardfel.
 - Eventuella avvikelser från denna testmetod och avvikelser från acceptanskriterierna, samt överväganden kring potentiella konsekvenser för testets resultat.
60. För resultaten av endpoint-mätningar bör medelvärden och deras standardavvikelser (om möjligt på både replikat- och koncentrationsbasis) presenteras.

LITTERATUR

- (1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.
- (1) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K och 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), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), 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 och 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 och 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 och 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 och 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 och 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 och 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 och 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 och 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) Förenta staternas miljöförvaldigheten (EPA, Environmental Protection Agency) (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Finns på <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>.
- (13) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P och 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.), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.
- (15) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ och 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 och Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
- (17) Koger CS, Teh SJ och 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 och Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley-Blackwell.
- (19) Gormley K och Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 330–338.

- (20) Kapitel C.15 i denna bilaga, Fisk, korttidstest avseende toxicitet på embryo- och säckyngelstadierna.
- (21) Kapitel C.37 i denna bilaga, 21-dagars test på fisk: En kortsiktig screening för ämnen med östrogen och androgen aktivitet samt aromatshämmande verkan.
- (22) Kapitel C.41 i denna bilaga, Test på fiskars könsutveckling.
- (23) Kapitel C.48 i denna bilaga, Korttidstest av reproduktion hos fisk.
- (24) Kapitel C.47 i denna bilaga, Toxicitetstest på fisk i tidiga levnadsstadier.
- (25) Kapitel C.49 i denna bilaga, Akut toxicitetstest på fiskembryo (FET).
- (26) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L och 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 och 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). Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.
- (29) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M och Scharthl 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 och 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 (bilagor till den här publikationen finns som ett separat dokument), OECD Publishing, Paris.
- (32) Green JW, Springer TA, Saulnier AN och Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108–1116.

Tillägg 1

DEFINITIONER

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

ELISA: enzymkopplad immunadsorberande analys (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Fekunditet: antal ägg.

Fertilitet: antal livskraftiga ägg/fekunditet.

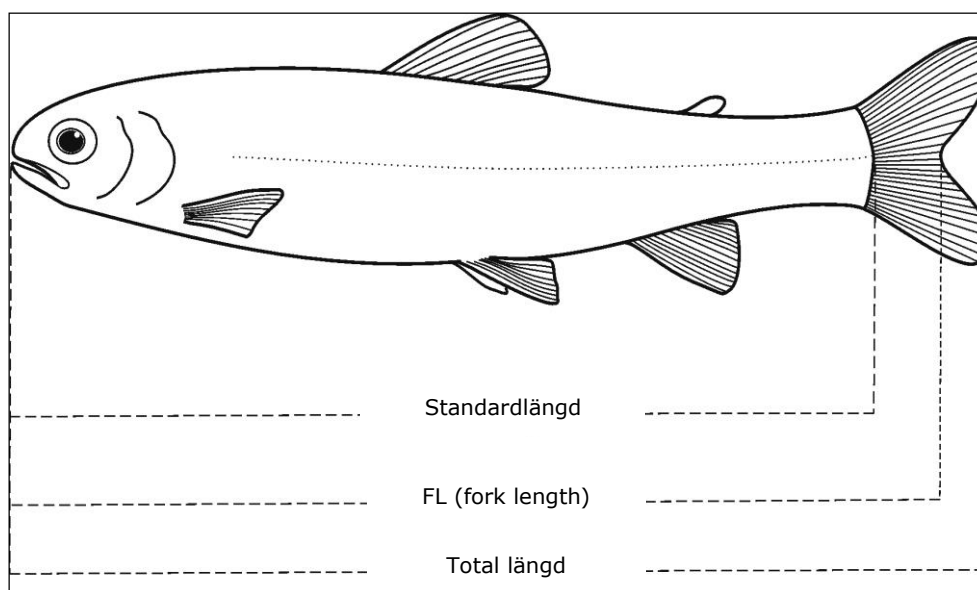
Fork length (FL): längd från nospetsen till stjärtfenans delning, används för fiskarter där det är svårt att säga var ryggraden slutar (www.fishbase.org).

Kläckbarhet: antal yngel/antal embryon placerade i en inkubator.

IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee.

Standardlängd (SL): längd från nospetsen till bakre änden av den sista ryggkotan eller till bakre änden av den mellersta delen av hypuralplattan. Enkelt uttryckt utesluter detta mått stjärtfenans längd. (www.fishbase.org)

Total längd (TL): längd från nospetsen till slutet av stjärtfenans längre flik, vanligen mätt med flikarna sammanförda längs mittlinjen. Detta är ett linjärt mått, som inte följer kroppskurvan. (www.fishbase.org)



Figur 1: Beskrivning av de olika längdmått som används

EC_x (koncentration som orsakar x % effekt): den koncentration som orsakar en x-procentig effekt på testorganismerna inom en given exponeringsperiod jämfört med en kontrollgrupp. Till exempel är EC₅₀ en koncentration som beräknas ha en effekt gällande en av testets endpoints för 50 % av en exponerad population under en fastställd exponeringsperiod.

Genomflödestest: ett test med ett kontinuerligt flöde av testlösningar genom testsystemet under exponeringens hela varaktighet.

HPG-axel: hypotalamus-hypofys-gonad-axeln.

IUPAC: Internationella kemiunionen (International Union of Pure and Applied Chemistry).

Fisktäthet: våtvikten fisk per vattenvolym.

Lägsta koncentration med observerad effekt (LOEC): den lägsta testade koncentration av en testkemikalie vid vilken man kan fastställa att testkemikalien har en statistiskt signifikant effekt (vid $p < 0,05$) jämfört med kontrollgruppen. Alla testkoncentrationer som är högre än LOEC bör även ha skadliga effekter som är lika stora som eller större än de effekter som observeras vid LOEC. Om dessa båda villkor inte är uppfyllda bör en fullständig förklaring ges till hur man har valt LOEC (och därmed NOEC). Närmare vägledning ges i tillägg 5 och 6.

Genomsnittlig dödlig koncentration (LC₅₀): den koncentration av en testkemikalie som uppskattas vara dödlig för 50 % av testorganismerna under testperioden.

Nolleffektkoncentration (NOEC): den testkoncentration omedelbart under LOEC som inom en fastställd exponeringsperiod inte framkallar någon statistiskt signifikant effekt ($p < 0,05$) jämfört med kontrollgruppen.

Smiles: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Antalstäthet: antalet fiskar per vattenvolym.

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

UVCB-ämnen: ämnen med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiska material.

VTG: vitellogenin är ett fosfolipoglykoprotein, en prekursor till ägguleprotein som normalt förekommer hos sexuellt aktiva honor inom alla äggläggande arter.

WPF (Weeks post fertilisation): veckor efter befruktning.

Tillägg 2**NÅGRA KEMISKA EGENSKAPER FÖR ETT GODTAGBART SPÄDVATTEN**

Ämne	Gränsvärde för koncentration
Partiklar	5 mg/l
Totalt organiskt kol	2 mg/l
Icke-joniserad ammoniak	1 µg/l
Restklor	10 µg/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska fosforföreningar	50 ng/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller klororganiska föreningar plus polyklorerade bifenyler	50 ng/l
Totalt organiskt klor	25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arsenik	1 µg/l
Krom	1 µg/l
Kobolt	1 µg/l
Koppar	1 µg/l
Järn	1 µg/l
Bly	1 µg/l
Nickel	1 µg/l
Zink	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Kvicksilver	100 ng/l
Silver	100 ng/l

Tillägg 3

TESTBETINGELSER FÖR MEOGRT-TESTET

- | | |
|--|---|
| 1. Rekommenderad art | Japansk risfisk (<i>Oryzias latipes</i>). |
| 2. Testtyp | Kontinuerligt genomflöde. |
| 3. Vattentemperatur | Den nominella testtemperaturen är 25 °C. Medeltemperaturen under testet i varje enskilt akvarium ska vara 24–26 °C. |
| 4. Belysningstyp | Fluorescerande lampor (brett spektrum och ~150 lumen/m ²) (~150 lux).

16 timmars ljus, 8 timmars mörker. |
| 6. Fisktäthet | F0: 2 vuxna fiskar/replikat; F1: inleds med maximalt 20 ägg (embryon)/replikat, minskas till 12 embryon/replikat vid kläckning och sedan till 2 vuxna fiskar (XX-XY-avelspar) vid 9–10 wpf för reproduktionsfasen. |
| 7. Minsta användbara volym för testkammare | 1,8 l (till exempel en testkammare med storleken: 18 × 9 × 15 cm). |
| 8. Volymutbyten av testlösningar | Minst 5 volymförnyelser/dygn till upp till 16 volymförnyelser/dygn (eller ett flöde på 20 ml/min). |
| 9. Testorganismernas ålder vid testets start | F0: > 12 wpf, men det rekommenderas att åldern inte överstiger 16 wpf. |
| 10. Antal organismer per replikat | F0: 2 fiskar (par av hane och hona); F1: maximalt 20 fiskar (ägg)/replikat (producerade från F0- och F1-avelspar). |
| 11. Antal behandlingar | 5 testkemikaliebehandlingar plus lämplig kontrollgrupp (eller lämpliga kontrollgrupper). |
| 12. Antal replikat per behandling | Minst 6 replikat per behandling för testkemikaliegrupper och minst 12 replikat för kontrollgruppen, liksom för kontrollgruppen med lösningsmedel om sådan används (antalet replikat fördubblas under reproduktionsfasen för F1). |
| 13. Antal organismer per test | Minst 84 fiskar i F0 och 504 fiskar i F1. (Om kontrollgrupp med lösningsmedel används, 108 fiskar i F0 och 648 fiskar i F1.) Den räknade enheten är individer efter stadiet som gulesäcksyngel. |
| 14. Utfodringsprogram | Fiskarna matas med saltkräfta, <i>Artemia</i> spp., (24 timmar gamla naupliuslarver) med fri tillgång (<i>ad libitum</i>), kompletterat med ett kommersiellt tillgängligt flingfoder vid behov. (Ett exempel på ett utfodringschema för att säkerställa tillfredsställande tillväxt och |

	utveckling, som stöd för en tillförlitlig reproduktion, finns i tillägg 5.)
15. Luftning	Ingen, såvida inte det upplösta syret närmar sig < 60 % av luftmättnadsvärdet.
16. Spädvatten	Rent ytvatten, brunnsvatten eller rekonstituerat vatten eller avklorerat kranvatten.
17. Exponeringsperiod	Huvudsakligen 19 veckor (från F0 till kläckning av F2).
18. Biologiska endpoints (primära)	Kläckbarhet (F1 och F2), överlevnad (F1, från kläckning till 4 wpf [slutet av yngelstadiet/början av juvenilstadiet], från 4 till 9 [eller 10] wpf [från början av juvenilstadiet till subadultstadiet] och från 9 till 15 wpf [från subadultstadiet till avlivning som vuxen fisk]), tillväxt (F1, längd och vikt vid 9 och 15 wpf), sekundära könskaraktärer (F1, papillära utväxter på analfenan vid 9 och 15 wpf), vitellogenin (F1, <i>vtg</i> -mRNA eller VTG-protein vid 15 wpf), fenotypiskt kön (F1, via histologisk undersökning av gonaderna vid 15 wpf), reproduktion (F0 och F1, fekunditet och fertilitet under 21 dygn), tid till lek (F1) och histopatologi (F1, gonader, lever och njurar vid 15 wpf).
19. Giltighetskriterier för testet	Upplöst syre ≥ 60 % av luftmättnadsvärdet, medelvattentemperatur på 24–26 °C under hela testet, framgångsrik reproduktion hos ≥ 65 % av honorna i kontrollgruppen (kontrollgrupperna), genomsnittlig daglig fekunditet på ≥ 20 ägg i kontrollgruppen (kontrollgrupperna), kläckbarhet på ≥ 80 % (i genomsnitt) i kontrollgrupperna (för såväl F1 som F2), överlevnad efter kläckning till 3 wpf på ≥ 80 % (i genomsnitt) och från 3 wpf till avslutandet av generationen på ≥ 90 % (i genomsnitt) i kontrollgrupperna (för F1), koncentrationerna av testkemikalien i lösningarna ska på ett tillfredsställande sätt hållas inom ± 20 % av de genomsnittliga uppmätta värdena.

Tillägg 4

VÄGLEDNING OM TYPISKA KONTROLLVÄRDEN

Det bör noteras att dessa kontrollvärden är baserade på ett begränsat antal valideringsstudier och att de kan komma att ändras när erfarenheten ökar.

Tillväxt

Vikt och längd mäts för alla fiskar som ingår i provtagningen vid 9 (eller 10) wpf och vid 15 wpf. När detta testprotokoll följs är den förväntade våtvikten vid 9 wpf 85–145 mg för hanar och 95–150 mg för honor. Den förväntade vikten vid 15 wpf är 250–330 mg för hanar och 280–350 mg för honor. Även om det kan finnas betydande avvikelser från dessa intervall för enskilda fiskar, tyder genomsnittliga vikter inom kontrollgruppen som ligger avsevärt utanför dessa intervall, i synnerhet om de ligger lägre, på problem med utfodringen, temperaturregleringen, vattenkvaliteten, sjukdomar eller någon kombination av dessa faktorer.

Kläckning

Andelen framgångsrikt kläckta ägg i kontrollgrupperna ligger normalt runt 90 %, men värden så pass låga som 80 % är inte ovanliga. Om andelen framgångsrikt kläckta ägg ligger under 75 % kan det tyda på otillräcklig rörelse av äggen som utvecklas eller otillräcklig omsorg vid hanteringen av äggen, till exempel att döda ägg inte avlägsnas i tid vilket leder till svampangrepp.

Överlevnad

Överlevnadstalen från kläckning och fram till 3 wpf och efter 3 wpf är normalt 90 % eller högre för kontrollgrupperna, men överlevnadstal under de tidiga levnadsstadierna som är så pass låga som 80 % för kontrollgrupperna är inte alarmerande. Överlevnadstal för kontrollgrupperna som ligger under 80 % ger dock anledning till oro och kan tyda på otillräcklig rengöring av akvarierna, vilket leder till förlust av fiskyngel genom sjukdomar eller genom kvävning till följd av låga nivåer av upplöst syre. Dödsfall kan även ske genom att fiskar skadas under rengöringen av akvariet eller genom att yngel försvinner ut genom akvariets utlopp.

Vitellogenin-genen

Även om de absoluta nivåerna av *vitellogenin*-genen (*vtg*), uttryckt som kopior/ng totalt mRNA, kan variera kraftigt mellan olika laboratorier till följd av de metoder eller den utrustning som används, ska *vtg*-förhållandet vara ungefär 200 gånger högre bland honorna i kontrollgruppen än bland hanarna i kontrollgruppen. Det är inte ovanligt att detta förhållande är så högt som 1 000 till 2 000, men om det är lägre än 200 finns det anledning till oro och det kan tyda på problem med kontaminering av prov eller med den metod och/eller de reagenser som används.

Sekundära könskaraktärer

För hanar är det normala intervallet av sekundära könskaraktärer, definierat som det totala antalet segment i fenestrållarna på analfenan med papillära utväxter, 40–80 segment vid 9–10 wpf. Vid 15 wpf bör intervallet för hanar i kontrollgruppen vara ungefär 80–120 och för honor i kontrollgruppen ska antalet vara 0. Av outredda skäl har vissa hanar i sällsynta fall inga papillära utväxter vid 9 wpf, men eftersom alla hanar i kontrollgrupperna utvecklar papillära utväxter senast vid 15 wpf beror detta sannolikt på en försenad utveckling. Om det förekommer papillära utväxter bland honorna i kontrollgruppen tyder detta på att det finns XX-hanar i populationen.

XX-hanar

Den normala bakomliggande incidensen av XX-hanar i odlingar verkar ligga runt 4 % eller lägre vid 25 °C och incidensen ökar med stigande temperatur. Åtgärder bör vidtas för att minimera andelen XX-hanar i populationen. Eftersom incidensen av XX-hanar verkar ha en genetisk komponent och därigenom är ärftlig, är övervakning av stammen och säkerställande att XX-hanar inte används för att föröka stammen ett effektivt sätt att minska incidensen av XX-hanar i populationen.

Fiskarnas lek

Fiskarnas lek i kontrollreplikaten bör övervakas dagligen innan fekunditetsbedömningen genomförs. Kontrollparen kan bedömas kvalitativt, med visuella metoder, för att styrka förekomsten av lekbeteende. Vid 12–14 wpf bör de flesta kontrollpar leka. Ett lågt antal lekande par vid denna tidpunkt tyder på potentiella problem med fiskarnas hälsa, mognad eller välbefinnande.

Fekunditet

Friska och väl utfodrade risfiskar på 12–14 wpf leker normalt dagligen och producerar mellan 15 och 50 ägg per dygn. Äggproduktionen för 16 av de rekommenderade 24 kontrollavelsparen (> 65 %) bör ligga på över 20 ägg per par och dygn och siffran kan nå så högt som 40 ägg per dygn. Ett lägre antal än 20 kan vara ett tecken på att de lekande paren är omogna, undernärda eller sjuka.

Fertilitet

Procentandelen befruktade (fertila) ägg för lekande kontrollpar ligger normalt runt 90 %, och det är inte ovanligt med värden från 95 % och uppåt. Fertilitetstal för ägg i kontrollgruppen som är lägre än 80 % ger anledning till oro och kan antingen vara ett tecken på sjuka individer eller på brister i fiskodlingens förhållanden.

Tillägg 5

EXEMPEL PÅ ETT UTFODRINGSSCHEMA

Ett exempel på ett utfodringsschema för att säkerställa tillfredsställande tillväxt och utveckling, som stöd för en tillförlitlig reproduktion, finns i tabell 1. Avvikelser från detta utfodringsschema kan vara godtagbara, men det rekommenderas att de i så fall testas och att det säkerställs att en godtagbar tillväxt och reproduktion kan observeras. För att det föreslagna utfodringsschemat ska kunna följas, måste torrvikten saltkräfta per volym med suspension av saltkräfta fastställas innan testet startar. Man kan göra detta genom att väga en definierad volym med suspension av saltkräfta som har fått torka under 24 timmar vid 60 °C i på förhand vägda skålar. För att ta hänsyn till salternas vikt i suspensionen ska en lika stor volym med samma saltlösning som används i suspensionen också torkas, vägas och därefter subtraheras från vikten av den torkade suspensionen av havskräfta. Alternativt kan saltkräftorna filtreras och sköljas med destillerat vatten före torkningen, vilket eliminerar behovet av att mäta vikten på motsvarande mängd salt. Informationen som erhålls används för att omvandla uppgifterna i tabellen från torrsvikt havskräfta till den volym med suspension av havskräfta som ska utfodras per fisk. Det rekommenderas även att alikvoter av suspensionen av havskräfta vägs varje vecka för att verifiera att korrekt torrsvikt havskräfta utfodras.

Tabell 1: Exempel på ett utfodringsschema

Tid (efter kläckning)	Havskräfta (mg torrsvikt/fisk/dygn)
Dag 1	0,5
Dag 2	0,5
Dag 3	0,6
Dag 4	0,7
Dag 5	0,8
Dag 6	1,0
Dag 7	1,3
Dag 8	1,7
Dag 9	2,2
Dag 10	2,8
Dag 11	3,5
Dag 12	4,2
Dag 13	4,5
Dag 14	4,8
Dag 15	5,2
Dag 16–21	5,6
Vecka 4	7,7
Vecka 5	9,0
Vecka 6	11,0
Vecka 7	13,5
Vecka 8 till avlivning	22,5

Tillägg 6

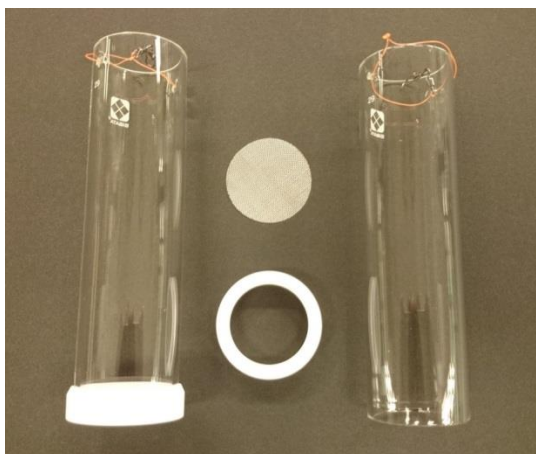
EXEMPEL PÅ EN INKUBATIONSKAMMARE FÖR ÄGG

Exempel A



Den här inkubatorn består av ett avdelat centrifugrör i glas, som ansluts via en hylsa i rostfritt stål och hålls på plats av centrifugrörets skruvlock. Ett litet rör av glas eller rostfritt stål tränger igenom locket och slutar nära den rundade botten, varigenom det försiktigt bubblar ut luft som får äggen att lyfta och minskar överföringen av saprofytiska svampinfektioner mellan äggen, samtidigt som utbytet av kemikalier mellan inkubatorn och akvariet den befinner sig i underlättas.

Exempel B



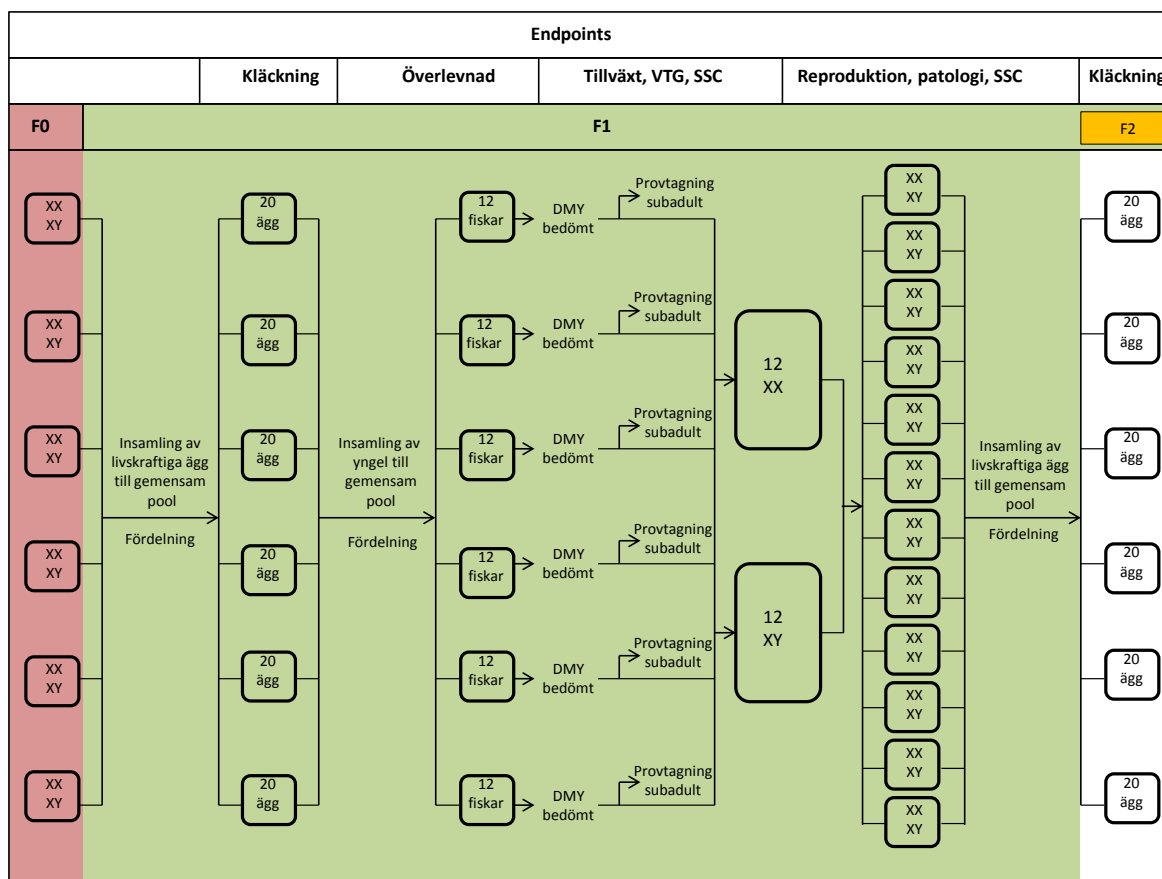


Den här inkubatorn består av en glascylinder (med 5 cm diameter och 10 cm höjd) och ett nät i rostfritt stål (0,25 ϕ och meshstorlek 32) som är fäst mot cylinderns botten med en PTFE-ring. Inkubatorerna hänger från lyftstången ned i akvarier och skakas vertikalt (med en amplitud på cirka 5 cm) i en lämplig cykel (ungefär en gång var fjärde sekund) för risfiskägg.

Tillägg 7

DIAGRAM ÖVER INSAMLING TILL EN GEMENSAM POOL OCH FÖRDELNING TILL REPLIKAT UNDER HELA MEOGRT-TESTET

Figur 1: Insamling till en gemensam pool och fördelning till replikat under hela MEOGRT-testet. Figuren representerar en behandlingsgrupp eller en halv kontrollgrupp. På grund av insamlingen till en gemensam pool är replikatidentiteten inte densamma under hela testet. Observera att begreppet ”ägg” syftar på livskraftiga, befruktade ägg (motsvarande embryon).



Behandlingar och replikation

För testmetoden rekommenderas fem testkemikaliebehandlingar med användning av kemikalier av teknisk kvalitet och en negativ kontroll. Antalet replikat per behandling förblir inte konstant under hela MEOGRT-testet och antalet replikat i kontrollbehandlingen är dubbelt så stort som för någon enskild testkemikaliebehandling. För F0 har varje testkemikaliebehandling sex replikat medan den negativa kontrollbehandlingen har tolv replikat. Det avråds starkt från användning av lösningsmedel, och om ett sådant ändå används ska en motivering såväl för användningen av lösningsmedlet som för valet av lösningsmedel tas med i MEOGRT-testrapporten. Om ett lösningsmedel används krävs dessutom två typer av kontrollgrupper: a) en lösningsmedelskontroll och b) en negativ

kontroll. Var och en av dessa båda kontrollgrupper ska vid varje tidpunkt i MEOGRT-tidslinjen bestå av en komplett uppsättning replikat. Under testorganismernas hela utvecklingsfas i F1-generationen (och i F2-generationen fram till kläckning) förblir denna replikatstruktur intakt. I det vuxna stadiet, när F1-avelspar bildas, ska dock antalet replikat med reproducerande par helst fördubblas per behandling; det ska således finnas upp till 12 replikatpar för varje testkemikaliebehandling och 24 replikatpar för kontrollgruppen (och ytterligare 24 replikatpar för kontrollgruppen med lösningsmedel, om sådan används). Kläckningen av embryona som har producerats av F1-paren undersöks med samma replikatstruktur som användes för embryona som producerades av F0-paren, det vill säga inledningsvis sex replikat per testkemikaliebehandling och tolv replikat i kontrollgruppen (eller kontrollgrupperna).

Tillägg 8

RÄKNING AV ANALFENANS PAPILLÄRA UTVÄXTER

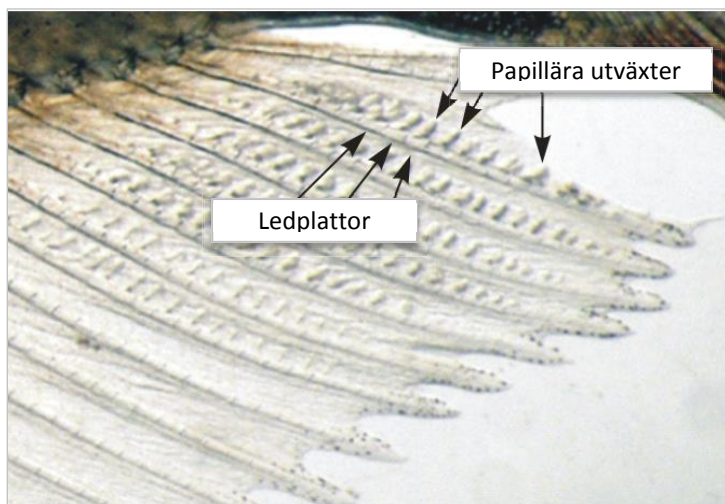
Huvudsaklig utrustning och huvudsakliga reagenser

- Dissektionsmikroskop (med kamera monterad om så önskas)
- Fixativ (till exempel Davidsons fixativ [Bouins fixativ rekommenderades inte]), om man inte väljer att räkna från en bild

Förfarande

Efter obduktionen bör en bild tas av analfenan för att möjliggöra en enkel räkning av analfenans papillära utväxter. Även om fotografering är den rekommenderade metoden, kan analfenan även fixeras med Davidsons fixativ eller annat lämpligt fixativ under ungefär en minut. Det är viktigt att hålla analfenan platt under fixeringen så att det sedan blir enklare att räkna de papillära utväxterna. Fisk kroppen med analfenan kan förvaras i Davidsons fixativ eller annat lämpligt fixativ tills det är dags för analys. Räkna antalet ledplattor (se **figur 1**) med papillära utväxter som sticker fram från ledplattans bakre kant.

Figur 1: Papillära utväxter på analfenan



Tillägg 9

DETALJERAD TIDSLINJE FÖR MEOGRT-TESTET

Testveckorna 1–3 (F0)

F0-generationen, som består av lekande fiskar som har uppfyllt urvalskriterierna (se punkterna 16–20), exponeras under tre veckor så att de framväxande könscellerna och gonadvävnaderna exponeras för testkemikalien. I varje replikatakvarium ska det endast finnas ett enda avelspar (avelspar med XX-hona och XY-hane). De lagda äggen samlas in, räknas och bedöms med avseende på fertilitet (befruktnings) under 21 på varandra följande dagar, med start testdag 1.

Testvecka 4 (F0 och F1)

Helst bör de befruktade och livskraftiga äggen (embryona) samlas in under en och samma dag, men finns det inte tillräckligt med embryon kan embryona samlas in under två dagar. Om insamlingen sker under två dagar ska alla embryon inom samma behandling som samlades in under den första dagen läggas samman med dem som samlades in under den andra dagen i en gemensam pool. Därefter fördelas de samlade embryona för varje behandling slumpvis till de olika replikatinkubatorerna med 20 embryon per inkubator. Eventuella dödsfall bland befruktade ägg (embryon) kontrolleras och registreras dagligen. Döda ägg tas bort från inkubatorerna (dödsfall bland befruktade ägg kan, särskilt i tidiga stadier, märkas genom en tydlig förlust av genomskinlighet och genom färgförändringar som orsakas av koagulering och/eller utfällning av protein, vilket leder till ett vitt och genomskinligt utseende, OECD 2010).

Anmärkning: Om någon av behandlingarna kräver en andra dag av insamling, måste alla behandlingar (inklusive kontrollgrupperna) följa detta förfarande. Om det efter den andra dagen av insamling fortfarande inte finns tillräckligt med embryon inom en behandling för att placera 20 embryon i varje inkubator, ska antalet embryon som används inom denna specifika behandling minskas till 15 embryon per inkubator. Om det inte finns tillräckligt med embryon för att placera 15 embryon i varje inkubator, ska antalet replikatinkubatorer minskas tills det finns tillräckligt med embryon för att placera 15 embryon i varje inkubator. Dessutom kan ytterligare avelspar tillföras till varje behandlingsgrupp och kontrollgrupp i F0 för öka produktionen av ägg, så att rekommendationen på 20 embryon per replikat uppnås.

På testdag 24 avlivas F0-avelsparen på ett skonsamt sätt och deras vikt och längd registreras. Vid behov kan F0-avelsparen eventuellt behållas ytterligare 1–2 dygn för att starta om F1.

Testveckorna 5–6 (F1)

Ett till två dygn innan kläckningen förväntas starta ska rörelsen av äggen i inkubatorn avbrytas eller minskas, för att påskynda kläckningen. Allteftersom embryona kläcks ska

ynghen varje dag samlas i en gemensam pool utifrån behandling och sedan systematiskt fördelas till de olika replikatakvarierna för yngel inom en viss behandling, med maximalt 12 yngel per akvarium. Detta görs genom att yngel slumpvis väljs ut, varefter ett yngel i taget placeras i replikat efter replikat med slumpens hjälp; på så sätt arbetar man sig igenom den specifika behandlingens replikat till dess att alla replikat inom behandlingen har 12 yngel. Om det inte finns tillräckligt med yngel för att fylla alla replikat, ska det säkerställas att så många replikat som möjligt har 12 yngel för att starta F1-fasen.

Ägg som inte har kläckts när det har gått dubbelt så lång tid som mediandagen för kläckning i kontrollgruppen räknas som ej levnadsdugliga och kasseras. Antalet yngel registreras och kläckningens resultat (kläckbarheten) beräknas för varje replikat.

Testveckorna 7–11 (F1)

Överlevnaden hos fiskynghen kontrolleras och registreras varje dag för samtliga replikat. På testdag 43 registreras antalet överlevande fiskar i varje replikat, liksom det antal fiskyngel som ursprungligen placerades i replikatet (nominellt 12 stycken). Därigenom går det att beräkna överlevnaden i procent från kläckning till stadiet för subadult fisk.

Testvecka 12 (F1)

Under testdagarna 78–85 ska ett litet prov tas från stjärten på varje enskild fisk för att fastställa det genotypiska könet för individen (det vill säga genom fenklippning). Denna information används för bildandet av avelspar.

Inom tre dygn från det att det genotypiska könet har fastställts för varje enskild fisk bildas 12 avelspar per behandling och 24 avelspar per kontrollgrupp på ett slumpvis sätt. Två XX- och två XY-fiskar från varje replikat väljs slumpvis ut och samlas sedan i en gemensam pool utifrån kön, varefter de med hjälp av slumpen väljs ut att bilda avelspar (det vill säga XX-XY-par). Minst 12 replikat per kemikaliebehandling och minst 24 replikat för kontrollgruppen bildas med ett avelspar per replikat. Om ett replikat saknar antingen två XX- eller två XY-fiskar för samlingen i en gemensam pool, ska fiskar med lämpliga könsgenotyper erhållas från andra replikat inom samma behandling.

De kvarvarande fiskarna (maximalt åtta fiskar per replikat) avlivas på ett skonsamt sätt och används för provtagning avseende de olika endpoint-värdena för subadult fisk. Dessutom sparas *dmy*-data (XX eller XY) för all undersökt subadult fisk, för att säkerställa att alla endpointdata kan kopplas till det genetiska könet för varje enskild fisk.

Testveckorna 13–14 (F1)

Exponeringen fortsätter medan de subadult avelsparen utvecklas till vuxna fiskar. På testdag 98 (det vill säga dagen innan ägginsamlingen påbörjas) avlägsnas alla ägg från såväl akvarierna som honorna.

Testveckorna 15–17 (F1)

De lagda äggen samlas in dagligen under 21 dagar i följd i varje replikat och bedöms med avseende på fekunditet och fertilitet.

Testvecka 18 (repetition av testvecka 4) (F1 och F2)

På morgonen testdag 120 samlas äggen in i alla replikatakvarier. De insamlade äggen bedöms och befruktade ägg (med filamenten avlägsnade) från vart och ett av avelsparen samlas i en gemensam pool för varje behandling, varefter de systematiskt fördelas till inkubationskammare för ägg med 20 befruktade ägg per inkubator. Inkubatorerna kan placeras i separata ”inkubationsakvarier” som har ställts i ordning för varje behandling eller i det replikatakvarium som efter kläckning kommer att innehålla de kläckta fiskynglen. Helst bör embryona samlas in under en och samma dag, men om det inte finns tillräckligt med embryon kan de samlas in under två dagar. Om insamlingen sker under två dagar ska alla embryon inom samma behandling som samlades in under den första dagen läggas samman med dem som samlades in under den andra dagen i en gemensam pool. Därefter fördelas de samlade embryona för varje behandling slumpvis till de olika replikatinkubatorerna med 20 embryon per inkubator. Anmärkning: Om någon av behandlingarna kräver en andra dag av insamling, måste alla behandlingar (inklusive kontrollgrupperna) följa detta förfarande. Om det efter den andra dagen av insamling fortfarande inte finns tillräckligt med embryon inom en behandling för att placera 20 embryon i varje inkubator, ska antalet embryon som används inom denna specifika behandling minskas till 15 embryon per inkubator. Om det inte finns tillräckligt med embryon för att placera 15 embryon i varje inkubator, ska antalet replikatinkubatorer minskas tills det finns tillräckligt med embryon för att placera 15 embryon i varje inkubator.

På testdag 121 (eller testdag 122 för att säkerställa att F2-generationen har fått en bra start) avlivs F1-avelsparen på ett skonsamt sätt och analyseras med avseende på endpointvärdena för vuxen fisk. Vid behov kan F1-avelsparen eventuellt behållas ytterligare 1–2 dygn för att starta om F2.

Testveckorna 19–20 (F2)

Ett till två dygn innan kläckningen förväntas starta ska rörelsen av äggen i inkubatorn avbrytas eller minskas, för att påskynda kläckningen. Om testet avslutas i och med slutförandet av kläckningen av F2-generationen, ska ynglen varje dag räknas och kasseras. (Embryon som inte har kläckts efter en lång inkuberingstid, vilket definieras som dubbelt så lång tid som mediandagen för kläckning i kontrollgruppen, räknas som ej levnadsdugliga.)

Tillägg 10

STATISTISK ANALYS

De typer av biologiska data som erhålls genom MEOGRT-testet är inte unika för testet och med undantag för patologiska data har många lämpliga statistiska metoder tagits fram för att på ett korrekt sätt analysera liknande data utifrån datauppgifternas egenskaper, vilket innefattar normalitet, varianshomogenitet, huruvida studiens utformning passar för hypotestest eller regressionsanalys, parametriska respektive icke-parametriska tester etc. Generellt sett följer de statistiska analyser som föreslås rekommendationerna från OECD gällande ekotoxicitetsdata (OECD 2006) och ett flödesschema över beslutsgången vid MEOGRT-dataanalys kan hittas i figur 2.

Det förväntas att datamängderna mestadels kommer att uppvisa monotona responser. Därtill bör det övervägas huruvida ett ensidigt statistiskt test eller ett tvåsidigt statistiskt test ska användas. Såvida det inte finns en biologisk motivering för att ett ensidigt test är olämpligt, rekommenderas det att ett ensidigt test används. Samtidigt som specifika statistiska tester rekommenderas i följande avsnitt ska, om lämpligare och/eller mer kraftfulla statistiska metoder finns framtagna för tillämpning på de specifika data som genereras i MEOGRT-testet, i stället sådana statistiska tester användas så att dessa fördelar kan utnyttjas.

MEOGRT-data ska analyseras separat för varje genotypiskt kön. Det finns två strategier för att analysera data för fisk som har bytt kön (antingen XX-hanar eller XY-honor). 1) Uteslut alla data för fiskar som har bytt kön inom hela testet, utom prevalensen av könsbyten inom varje enskilt replikat. 2) Behåll data för alla fiskar som har bytt kön i datamängden och analysera data baserat på genotyp.

Histopatologiska data

Histopatologiska data rapporteras i form av allvarlighetsgrader, vilka bedöms med hjälp av en nyutvecklad statistisk metod, RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) (Green m.fl., 2014). Anpassningen *Rao-Scott* bevarar information gällande testreplikationen medan metoden *by Slices* inkluderar den biologiska förväntan att allvarlighetsgraden tenderar att öka med ökande behandlingskoncentrationer. För varje diagnos specificerar RSCABS-resultaten vilka behandlingar som har högre prevalens för patologi än kontrollgrupperna och den tillhörande allvarlighetsnivån.

Fekunditetsdata

Analyser av fekunditetsdata sker genom ett step-down-test av typen Jonckheere-Terpstra eller Williams test för att fastställa behandlingens effekter, förutsatt att data överensstämmer med en monoton koncentrationsrespons. Med ett step-down-test görs alla jämförelser vid signifikansnivån 0,05 och utan justering för antalet gjorda jämförelser. Data förväntas överensstämma med en monoton koncentrationsrespons, men detta kan verifieras antingen genom visuell inspektion av data eller genom framtagning av linjära och kvadratiska kontraster för behandlingarnas medelvärden efter en rangordningsomvandling av data.

Såvida inte den kvadratiska kontrasten är signifikant och den linjära kontrasten är icke-signifikant kan trendtestet betraktas som slutfört. I annat fall används Dunnetts test för att fastställa behandlingseffekterna, om data är normalfördelade med homogena varianser. Om dessa krav inte är uppfyllda används Dunns test med en Bonferonni-Holm-justering. Alla angivna tester utförs oberoende av eventuella övergripande F- eller Kruskal-Wallis-tester. Närmare upplysningar anges i OECD 2006.

Alternativa metoder kan användas, som en generaliserad linjär modell med Poisson-fel för äggräkning (utan omvandling), om detta kan motiveras statistiskt (Cameron och Trividi, 2013). Rådfrågning av statistikexpertis rekommenderas om en alternativ metod används.

Daglig äggräkning inom en och samma generation

För variansanalysmodellen (ANOVA-modellen) gäller att $Y = \text{Tid} * \text{Tid} + \text{Behandling} + * \text{Behandling} + \text{Tid} * \text{Behandling} + * \text{Tid} * \text{Behandling}$, med slumpmässiga effekter för Replikat($\text{Generation} * \text{Behandling}$) och $\text{Tid} * \text{Replikat}(\text{Behandling})$, vilket möjliggör komponenter med ojämn varians av båda typer mellan generationer. Här syftar *tid* på hur ofta äggräkningen äger rum (till exempel varje dag eller varje vecka). Detta är en analys avseende upprepade mätningar, där korrelationerna mellan observationer gällande samma replikat förklarar datauppgifternas karaktär av upprepade mätningar.

Huvudeffekterna av *behandling* testas med hjälp av Dunnetts test (eller Dunnett-Hsus test), som tar hänsyn till antalet jämförelser. Justeringar krävs för huvudeffekten av *generation* eller *tid*, eftersom det för dessa båda faktorer inte finns någon "kontrollnivå" och varje par av nivåer utgör en jämförelse av möjligt intresse. För dessa båda huvudeffekter kan, om F-testet för huvudeffekten är signifikant på 0,05-nivån, de parvisa jämförelserna mellan olika nivåer av faktorn testas på 0,05-nivån utan ytterligare justering.

Modellen innefattar två- och trefaktorinteraktioner, vilket innebär att en huvudeffekt för exempelvis *tid* eventuellt inte är signifikant trots att *tid* har en signifikant påverkan på resultaten. Detta innebär att om en två- eller trefaktorinteraktion som innefattar *tid* är signifikant på 0,05-nivån, så kan man acceptera jämförelserna av nivåer av *tid* på 0,05-signifikansnivån utan ytterligare justering.

Därefter följer F-tester gällande signifikansen av *behandling* sett till *tid*, de så kallade skivorna ("slices") i variansanalystabellen. Om exempelvis skivan för *behandling* inom F1 och *tid* 12 är signifikant på 0,05-nivån, kan de parvisa jämförelserna för *behandling* inom F1 och *tid* 12 accepteras på 0,05-nivå utan ytterligare justering. Liknande påståenden gäller för tester avseende *tid* inom F1 och *behandling* och för *generation* inom en *tid* och *behandling*.

Slutligen gäller för jämförelser som inte faller under någon av ovanstående kategorier att jämförelser ska justeras med användning av Bonferroni-Holm-justeringen för p-värden. Ytterligare information om analyser av sådana modeller kan hittas i Hocking (1985) och Hochberg och Tamhane (1987).

Alternativt registreras rådata som presenteras i testrapporten som fekunditeten (antalet ägg) per replikat för varje dygn. Replikatets genomsnitt inom dessa rådata ska då beräknas med en kvadratrotstransformation. En ensidig variansanalys för de transformerade replikatgenomsnitten ska beräknas följt av Dunnett-kontraster. Det kan även vara till hjälp att visuellt inspektera fekunditetsuppgifterna för varje behandling och/eller replikat via ett punktdiagram som visar data i förhållande till tid. På så sätt går det att göra en informell bedömning av de potentiella effekterna över tid.

Alla övriga biologiska data

De statistiska analyserna är baserade på det underliggande antagandet att med rätt val av dos blir data monotona. Följaktligen förväntas data vara monotona och de utvärderas formellt med avseende på monotonicitet med användning av linjära och kvadratiske kontraster. Om data är monotona rekommenderas ett Jonckheere-Terpstra-test för trender inom replikats medianvärden (enligt rekommendationerna i OECD 2006). Om den kvadratiske kontrasten är signifikant och den linjära kontrasten inte är det, anses data vara icke-monotona.

Om data är icke-monotona, i synnerhet om det beror på reducerad respons hos behandlingen med högst koncentration eller de båda behandlingar som har högst koncentrationer, bör det övervägas om datamängden ska censureras så att analysen utförs utan dessa behandlingar. Detta beslut måste fattas genom professionell bedömning och utifrån alla tillgängliga data, i synnerhet data som indikerar uppenbar toxicitet vid dessa behandlingsnivåer.

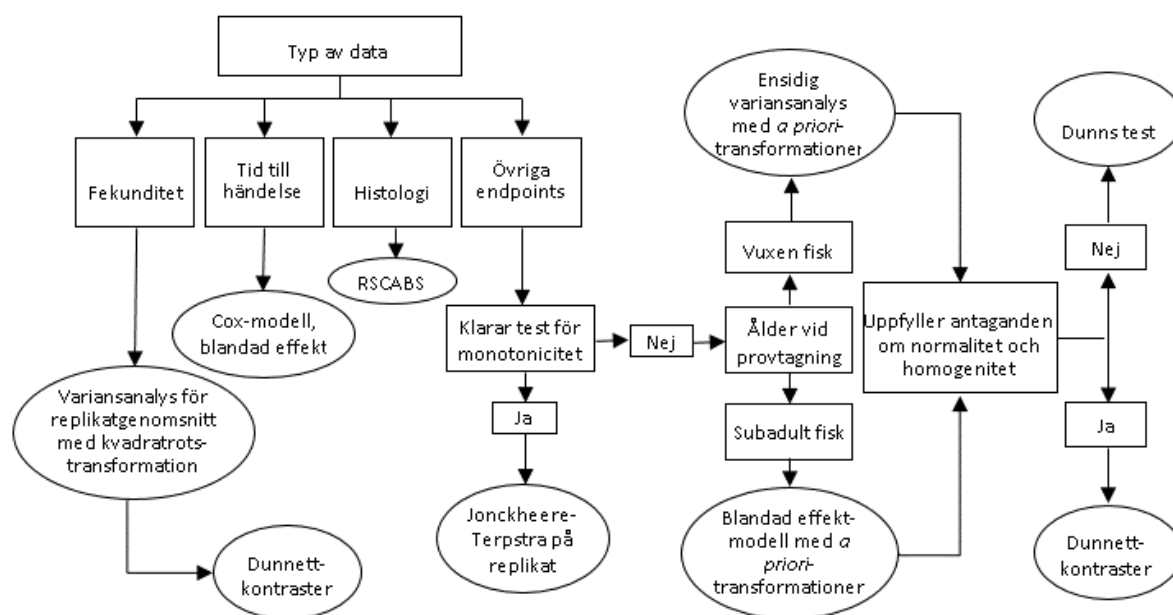
För vikt och längd rekommenderas inga transformationer, även om sådana då och då kan behövas. Det rekommenderas dock att man gör en logaritmisk transformation för vitellogenin-data, en kvadratrotstransformation för SSC-data (papillära utväxter på analfenan) och en arcussinus-kvadratrotstransformation för data gällande andelen kläckta ägg, överlevnaden i procent, könsfördelningen och procentandelen fertila (befruktade) ägg. Tiden till kläckning och tiden till första lektillfälle ska behandlas som "tid till händelse"-data, där individuella embryon som inte kläcks inom den definierade perioden eller replikat som aldrig leker behandlas som högercensurerade data. Tiden till kläckning ska beräknas utifrån mediandagen för kläckning för varje replikat. Dessa endpoints bör analyseras med användning av en proportionell riskmodell av Cox-typ med blandade effekter.

Biologiska data från prov på vuxna fiskar har en mätning per replikat, det vill säga det finns en XX-fisk och en XY-fisk per replikatakvarium. Därför rekommenderas det att en ensidig variansanalys görs på replikatgenomsnitten. Om variansanalysens förutsättningar (normalitet och varianshomogenitet, enligt bedömning utifrån residualerna från variansanalys med Shapiro-Wilks test respektive Levenes test) är uppfyllda, ska Dunnett-kontraster användas för att fastställa behandlingar som avviker från kontrollgruppen. Om å andra sidan variansanalysens förutsättningar inte är uppfyllda, ska ett Dunns test utföras för att fastställa vilka behandlingar som avviker från kontrollgruppen. Ett liknande förfarande rekommenderas för data som är i form av procentantal (fertilitet, kläckning och överlevnad).

Biologiska data från prov på subadult fisk har mellan en och åtta mätningar per replikat, vilket innebär att det kan vara ett varierande antal individer som bidrar till replikatets

genomsnitt för varje genotypiskt kön. Därför rekommenderas det att en variansanalysmodell med blandade effekter används följt av Dunnett-kontraster, om förutsättningarna gällande normalitet och varianshomogenitet är uppfyllda (utifrån residualerna från variansanalysen med blandade effekter). Om de inte är uppfyllda ska ett Dunns test utföras för att fastställa vilka behandlingar som avviker från kontrollgruppen.

Figur 2: Flödesschema över de rekommenderade statistiska metoderna för analys av MEOGRT-data.



Litteratur

- (1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (bilagor till den här publikationen finns som ett separat dokument), OECD Publishing, Paris.
- (2) Cameron AC och 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, Kalifornien: Brooks/Cole.
- (4) Hochberg Y och Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

C.53 TEST AVSEENDE TILLVÄXT OCH UTVECKLING HOS GRODYNGEL

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje 241 (2015). Behovet av att utveckla och validera ett test som kan identifiera och karakterisera de negativa konsekvenserna av exponering för giftiga kemikalier hos groddjur härrör från farhågor att koncentrationen av kemikalier i miljön kan orsaka skadliga effekter gällande både människor och vilda djur. OECD-testriktlinjen för LAGDA-testet (test avseende tillväxt och utveckling hos grodyngel, Larval Amphibian Growth and Development Assay) beskriver ett toxicitetstest med en groddjursart som följer djurens tillväxt och utveckling från befruktning och genom den tidiga juvenila perioden. Testet (som normalt pågår under 16 veckor) bedömer djurens tidiga utveckling, metamorfos, överlevnad, tillväxt och partiella reproduktiva mognad. Det kan även användas för att mäta en rad andra endpoints som möjliggör diagnostisk bedömning av misstänkta hormonstörande ämnen (EDC-ämnen, Endocrine Disrupting Chemicals) eller andra typer av giftiga ämnen som påverkar utvecklingen eller reproduktionen. Arbetsmetoden som beskrivs i den här testmetoden härrör från valideringsarbete som utförts på den afrikanska klogrodan (*Xenopus laevis*) av Förenta staternas miljöförvaltningsmyndighet (EPA) med stöd av japanskt forskningsarbete (1). Även om andra groddjursarter kan anpassas till ett testprotokoll avseende tillväxt och utveckling där förmågan att avgöra det genetiska könet är en viktig komponent, är de specifika metoder och observerbara endpoints som anges i denna testmetod endast tillämpliga för *Xenopus laevis*.
2. LAGDA-testet är ett test med groddjur på högre nivå ("higher tier test") för insamling av mer omfattande information om koncentrationsrespons rörande skadliga effekter, som lämpar sig för användning vid identifiering och karakterisering av faror och vid bedömning av ekologiska risker. Testet passar för nivå 4 i OECD:s ramverk för testning och bedömning av hormonstörande ämnen (OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters), där in vivo-tester också tillhandahåller data om skadliga effekter gällande endpoints som är relevanta för det endokrina systemet (2). Testet går i stora drag ut på att exponera *Xenopus laevis*-embryon i NF-stadium (Nieuwkoop och Faber) 8–10 (3) för minst fyra olika koncentrationer av testkemikalien (normalt med koncentrationsintervall som inte understiger halvlogaritmiska intervall), samtidigt som det ska finnas en kontrollgrupp (eller flera kontrollgrupper), och denna exponering ska pågå fram till 10 veckor efter mediantiden för NF-stadium 62 i kontrollgruppen, med en mellanliggande delprovtagning vid NF-stadium 62 (≤ 45 dygn efter befruktning [dpf, "days post fertilisation"], normalt i närheten av 45 dpf). Det ska finnas fyra replikat för varje testkoncentration och åtta replikat för kontrollgruppen. De endpoints som utvärderas under

exponeringens förlopp (vid den mellanliggande delprovtagningen och vid den slutliga provtagningen vid testets slut) innefattar sådana endpoints som tyder på allmän toxicitet: dödlighet, onormalt beteende och tillväxtmått (längd och vikt), liksom endpoints som är framtagna för att känneteckna specifika hormonella verkningsmekanismer gällande toxicitet, med fokus på östrogen-, androgen- eller sköldkörtelmedierade fysiologiska processer. Metoden lägger tonvikten primärt vid potentiella populationsrelevanta effekter (det vill säga negativ påverkan på överlevnad, utveckling, tillväxt och reproduktiv utveckling) för beräkning av en nolleffektkoncentration (NOEC, No Observed Effect Concentration) eller en effektiv koncentration som orsakar x % förändring (EC_x, Effect Concentration) för den uppmätta endpointen. Det bör dock noteras att EC_x-strategier sällan lämpar sig för stora studier av den här typen, där en ökning av antalet testkoncentrationer för att möjliggöra ett fastställande av önskat EC_x-värde kan stöta på praktiska problem. Det bör även noteras att metoden inte omfattar själva reproduktionsfasen. Definitioner av begrepp som används i denna testmetod finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

3. Till följd av det begränsade antalet kemikalier som testats och det begränsade antalet laboratorier som varit involverade i valideringen av detta relativt komplicerade test – i synnerhet är, än så länge, inte reproducerbarheten mellan laboratorier dokumenterad med experimentella data – kan det förväntas att när ett tillräckligt antal studier finns tillgängliga för att det ska gå att utvärdera effekterna av denna nya testutformning kommer OECD:s testriktlinje 241 att gås igenom och vid behov revideras i ljuset av den vunna erfarenheten. LAGDA-testet är ett viktigt test för att visa på potentiella bidragande faktorer till minskade groddjurspopulationer genom en bedömning av effekterna av exponering för kemikalier under det känsliga yngelstadiet, där effekter som rör överlevnad och utveckling, inklusive normal utveckling av de reproduktiva organen, kan få en negativ påverkan på populationer.
4. Testet är utformat för att detektera en apikal effekt (eller flera apikala effekter) som är en följd av såväl endokrina som icke-endokrina mekanismer, och det innefattar diagnostiska endpoints som delvis är specifika för viktiga endokrina modaliteter. Det bör noteras att innan LAGDA-testet utvecklades fanns det inget validerat test som fyllde denna funktion för groddjur.
5. Innan testet inleds är det viktigt att ha information om testkemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper, framför allt för att möjliggöra framtagningen av stabila kemiska lösningar. Det är även nödvändigt att ha en tillräckligt känslig analytisk metod för att verifiera testkemikaliens koncentrationer. Under ett tidsförlopp på ungefär 16 veckor kräver testet totalt 480 djur, det vill säga *Xenopus laevis*-embryon, (eller 640 embryon om en kontrollgrupp med lösningsmedel används) för att säkerställa en tillräcklig tillförlitlighet

hos testresultaten för bedömning av populationsrelevanta endpoints som tillväxt, utveckling och reproduktiv mognad.

6. Innan testmetoden används för testning av en blandning för tillsynsändamål, bör man överväga huruvida den kommer att ge godtagbara resultat för det avsedda tillsynsändamålet. Det bör även nämnas att detta test inte bedömer fekunditeten direkt, så det kan hända att det inte går att använda för ett mer avancerat skede än nivå 4 i OECD:s ramverk för testning och bedömning av hormonstörande ämnen.

VETENSKAPLIG GRUND FÖR TESTMETODEN

7. En stor del av vår nuvarande kunskap om groddjurens biologi har erhållits med hjälp av den laboratorieodlade modellarten *Xenopus laevis*. Den här arten kan odlas rutinmässigt i laboratoriet, ovulation kan framkallas med användning av humant koriongonadotropin (hCG) och det går lätt att få tag på djurstammar från kommersiella uppfödare.
8. Precis som för alla ryggradsdjur styrs reproduktionen hos groddjur av HPG-axeln (hypotalamus-hypofys-gonad-axeln) (4). Östrogener och androgener är mediatorer i detta endokrina system och styr utvecklingen och fysiologin för sexuellt dimorfa vävnader. Det finns tre distinkta faser i livscykeln för groddjur då den här axeln är särskilt aktiv: 1) gonaddifferentiering under yngelutvecklingen, 2) utveckling av sekundära könskaraktärer och gonadmognad under fasen som juvenila grodor och 3) funktionell reproduktion hos vuxna djur. Vart och ett av dessa tre utvecklingsfönster är sannolikt mottagligt för endokrina störningar orsakade av vissa kemikalier som östrogener och androgener, vilket i slutänden kan leda till förlust av organismernas reproduktionsduglighet.
9. Gonaderna börjar utvecklas i NF-stadium 43, då den bipotentiella genitalåsen först utvecklas. Differentieringen av gonaderna börjar i NF-stadium 52 när primordiala könsceller antingen migrerar till märgvävnaden (hanar) eller förblir kvar i barkområdet (honor) hos de framväxande gonaderna (3). Denna könsdifferentieringsprocess hos gonaderna rapporterades vara känslig för kemiska förändringar hos *Xenopus* för första gången under 1950-talet (5) (6). Exponering av grodyngel för östradiol under den här perioden med gonaddifferentiering resulterar i könsbyte för hanar som när de når vuxet stadium är fullt fungerande honor (7) (8). Det är likaså möjligt för honor att genomgå ett funktionellt könsbyte till hanar och detta har rapporterats efter transplantation av testikelvävnad till grodyngel (9). Även om exponering för en aromatashämmare också orsakar funktionellt könsbyte hos *Xenopus tropicalis* (10), har dock detta inte visat sig vara fallet för *Xenopus laevis*. Historiskt sett har giftiga kemikaliers påverkan på gonaddifferentieringen bedömts genom histologisk undersökning av gonaderna vid metamorfos och könsbyte har bara kunnat fastställas genom analys av könsfördelningen. Fram till nyligen har det inte funnits något sätt att direkt fastställa det genetiska könet för

Xenopus. Fastställandet av könskopplade markörer hos *Xenopus laevis* under senare tid gör det dock numera möjligt att fastställa det genetiska könet och skapar förutsättningar för en direkt identifiering av djur som har bytt kön (11).

10. Hos hanar fortsätter den juvenila utvecklingen i takt med att nivåerna av testosteron i blodet ökar, vilket är kopplat till utvecklingen av sekundära könskaraktärer och utvecklingen av testiklar. Hos honor produceras östradiol av äggstockarna, vilket leder till uppträdande av vitellogenin (VTG) i plasman och vitellogena oocyter i äggstockarna, samt utveckling av äggledare (12). Äggledare är sekundära könskaraktärer för honor som har en funktion vid oocytmognaden under reproduktionen. Ett geléaktigt hölje bildas på utsidan av oocyterna när de passerar genom äggledaren och samlas i äggsäcken, redo för befruktning. Utvecklingen av äggledarna verkar styras av östrogener, eftersom utvecklingen korrelerar med östradiolnivåerna i blodet hos *Xenopus laevis* (13) och *Xenopus tropicalis* (12). Utveckling av äggledare hos hanar efter exponering för PCB-föreningar (polyklorerade bifenyl) (14) och 4-*tert*-oktylfenol (15) har rapporterats.

TESTETS PRINCIP

11. Testet går ut på att, via vattnet, exponera *Xenopus laevis*-embryon i NF-stadium 8–10 för fyra olika koncentrationer av testkemikalien, samtidigt som det ska finnas en kontrollgrupp (eller flera kontrollgrupper), och denna exponering ska pågå fram till 10 veckor efter mediantiden för NF-stadium 62 i kontrollgruppen, med en mellanliggande delprovtagning vid NF-stadium 62. Även om det också kan vara möjligt att dosera mycket hydrofoba kemikalier via fodret, finns det än så länge inte särskilt mycket erfarenhet av att använda detta exponeringssätt i detta test. Det ska finnas fyra replikat för varje testkoncentration och åtta replikat för varje använd kontrollgrupp. De endpoints som utvärderas under exponeringens förlopp innefattar sådana endpoints som tyder på allmän toxicitet (det vill säga dödlighet, onormalt beteende och tillväxtmått [längd och vikt]), liksom endpoints som är framtagna för att känneteckna specifika hormonella verkningsmekanismer gällande toxicitet med fokus på östrogen-, androgen- eller sköldkörtelmedierade fysiologiska processer (det vill säga histopatologi gällande sköldkörteln, histopatologi gällande gonader och gonadernas gångar, onormal utveckling, vitellogenin i plasma [frivilligt] och genotypiska/fenotypiska könsfördelningar).

GILTIGHETSKRITERIER FÖR TESTET

12. Följande kriterier ska vara uppfyllda för att testet ska bedömas som giltigt:

- Koncentrationen upplöst syre ska vara ≥ 40 % av luftmättnadsvärdet under hela testet.

- Vattentemperaturen ska ligga inom intervallet 21 ± 1 °C och skillnaderna mellan olika replikat och olika behandlingar ska inte överskrida 1,0 °C.
 - pH-värdet för testlösningen ska hållas mellan 6,5 och 8,5 och skillnaderna mellan olika replikat och olika behandlingar ska inte överskrida 0,5.
 - Bevis ska finnas tillgängliga som visar att koncentrationerna av testkemikalien i lösningarna på ett tillfredsställande sätt har hållits inom ± 20 % av de genomsnittliga uppmätta värdena.
 - Dödligheten under exponeringsperioden ska vara ≤ 20 % i varje enskilt replikat i kontrollgrupperna.
 - Äggen som väljs ut för att starta testet ska ha en viabilitet på ≥ 70 %.
 - Mediantiden till NF-stadium 62 ska vara ≤ 45 dygn i kontrollgrupperna.
 - Den genomsnittliga vikten för testorganismerna vid NF-stadium 62 och vid testets slut i kontrollgruppen och kontrollgruppen med lösningsmedel (om sådan används) ska vara $1,0 \pm 0,2$ g respektive $11,5 \pm 3$ g.
13. Även om det inte är ett giltighetskriterium för testet, rekommenderas det att åtminstone tre behandlingsnivåer med tre giltiga replikat finns tillgängliga för analys. Alltför hög dödlighet, som påverkar giltigheten för en behandling, definieras som > 4 dödsfall (> 20 %) i två eller fler replikat som inte kan förklaras av tekniska fel. Minst tre behandlingsnivåer utan uppenbar toxicitet bör finnas tillgängliga för analys. Tecken på uppenbar toxicitet kan vara, men är inte begränsat till, att yngel flyter på ytan, ligger på akvariets botten, simmar upp och ned eller med ojämna rörelser, inte går upp till ytan och inte reagerar på stimuli, liksom morfologiska missbildningar (till exempel missbildade lemmar), blödande lesioner och buködem.
14. Om en avvikelse från giltighetskriterierna för testet observeras, bör konsekvenserna av detta beaktas i förhållande till testresultatens tillförlitlighet och dessa avvikelser och beaktanden bör tas med i testrapporten.

BESKRIVNING AV METODER

Utrustning

15. Normal laboratorieutrustning och i synnerhet följande:

- a) Utrustning för temperaturreglering (till exempel värmare eller kylare som kan ställas in på 21 ± 1 °C).
- b) Termometer.
- c) Binokulärt dissektionsmikroskop och dissektionsverktyg.

- d) Digitalkamera med minst fyra megapixels upplösning och mikrofunktion (vid behov).
- e) Analysvåg som klarar att mäta ned till 0,001 mg (1 µg).
- f) Mätare för upplöst syre och pH-mätare.
- g) Ljusintensitetsmätare som kan mäta i lux.

Vatten

Källa och kvalitet

16. Alla typer av spädvatten som finns att tillgå lokalt (till exempel källvatten eller kolfilterrenat kranvatten) och som möjliggör normal tillväxt och normal utveckling hos *Xenopus laevis* kan användas, och det ska finnas bevis som styrker normal tillväxt i detta vatten. Eftersom den lokala vattenkvaliteten kan variera avsevärt från ett område till ett annat bör vattenkvaliteten analyseras, i synnerhet om historiska data om vattnets användbarhet för odling av grodyngel inte finns att tillgå. Mätningar av tungmetaller (till exempel Cu, Pb, Zn, Hg, Cd och Ni), viktiga anjoner och katjoner (till exempel Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- och SO_4^{2-}), bekämpningsmedel, totalt organiskt kol och uppslammade fasta substanser bör utföras innan testningen påbörjas och/eller exempelvis var sjätte månad i fall där man vet att spädvattnet håller en relativt jämn kvalitet. Några kemiska egenskaper för ett godtagbart spädvatten anges i tillägg 2.

Jodidkoncentrationen i testvattnet

17. För att sköldkörteln ska kunna bilda sköldkörtelhormoner som skapar förutsättningar för en normal metamorfos, måste tillräckligt med jodid finnas tillgängligt för ynglen via en kombination av vatten- och foderkällor. För närvarande finns det inga empiriskt framtagna riktlinjer som anger de minimala jodidkoncentrationerna, vare sig för foder eller för vatten, för att säkerställa en korrekt utveckling. Tillgången på jodid kan dock påverka sköldkörtelsystemets mottaglighet för sköldkörtelaktiva ämnen, och det är välkänt att jodid påverkar sköldkörtelns grundläggande aktivitet, vilket bör uppmärksammas vid tolkning av resultaten från sköldkörtelns histopatologi. Tidigare arbeten har visat på ett framgångsrikt utförande av testet när spädvattnets jodidkoncentration (I^-) har legat mellan 0,5 och 10 µg/l. Helst bör den lägsta förekommande jodidkoncentrationen i spädvattnet under hela testet vara 0,5 µg/l (tillsatt som natrium- eller kaliumsalt). Om testvattnet har rekonstituerats från avjoniserat vatten bör jod tillsättas med en koncentration på minst 0,5 µg/l. De uppmätta jodidkoncentrationerna i testvattnet (det vill säga spädvattnet) och kompletteringen av testvattnet med jodsalter eller andra salter (när så är aktuellt) bör redovisas. Jodinhållet kan, förutom i spädvattnet, även mätas i fodret (fodren).

Exponeringssystem

18. Testet har tagits fram med användning av ett utspädningsystem med genomflöde. Systemkomponenter som ska vara i kontakt med vatten bör vara av glas, rostfritt stål och/eller andra kemiskt inerta material. Exponeringsakvarierna ska vara av glas eller rostfritt stål och ha en användbar volym på mellan 4,0 och 10,0 liter (med ett minsta vattendjup på 10–15 cm). Systemet ska kunna klara att hantera alla exponeringskoncentrationer, en kontrollgrupp och en kontrollgrupp med lösningsmedel (vid behov) med fyra replikat per behandling och åtta för kontrollgrupperna. Flödes hastigheten till varje akvarium ska vara konstant, med tanke på såväl bevarandet av de biologiska betingelserna som den kemiska exponeringen. Det rekommenderas att använda lämpliga flödes hastigheter (till exempel minst fem volymbyten i akvariet per dygn) för att undvika att kemikaliekoncentrationen sjunker till följd av metabolism från såväl testorganismerna som vattenlevande mikroorganismer som finns i akvarierna, abiotisk nedbrytning (hydrolys, fotolys) eller upplösning (förångning, sorption). Behandlingsakvarierna bör tilldelas sina platser i exponeringssystemet slumpmässigt, för att minska eventuella positionsberoende effekter, inbegripet små variationer i temperatur, ljusintensitet etc. Ytterligare information om inrättandet av exponeringssystem med genomflöde kan erhållas från ASTM:s *Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians* (16).

Tillsats av kemikalier: beredning av testlösningar

19. För att bereda testlösningar i exponeringssystemet ska stamlösningen av testkemikalien doseras i exponeringssystemet med en lämplig pump eller annan anordning. Flödes hastigheten för stamlösningen ska kalibreras utifrån en analytisk bekräftelse av testlösningarnas koncentration innan exponeringen påbörjas, samt kontrolleras volumetriskt med jämna mellanrum under testet. Testlösningen i varje kammare ska förnyas med minst 5 volymbyten/dygn.
20. Vilken metod som används för att tillsätta testkemikalien i systemet kan variera beroende på kemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper. Därför ska, innan testet påbörjas, grundläggande information om kemikalien som är relevant för att fastställa dess testbarhet erhållas. Till användbar information rörande testkemikaliespecifika egenskaper hör strukturformel, molekylvikt, renhet, stabilitet i vatten och ljus, pK_a och K_{ow} , vattenlöslighet (helst i testmediet) och ångtryck, liksom resultaten av ett test avseende lätt bionedbrytbarhet (testmetod C.4 [17] eller C.29 [18]). Löslighet och ångtryck kan användas för att beräkna Henrys lags konstant, som anger huruvida förluster till följd av avdunstning av testkemikalien kan uppstå. Om informationen som anges ovan saknas bör det övervägas noga om testet kan utföras, eftersom testets utformning är beroende av testkemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper och utan dessa data kan testresultaten bli svåra att tolka eller helt meningslösa. Man bör ha tillgång till en tillförlitlig analysmetod för kvantifiering av testkemikalien i testlösningarna, med känd och redovisad noggrannhet

och detektionsgräns. Vattenlösliga testkemikalier kan upplösas i alikvoter av spädvatten, vid en koncentration som möjliggör leverans vid den avsedda testkoncentrationen i ett genomflödessystem. Kemikalier som är flytande eller fasta i rumstemperatur och som är måttligt lösliga i vatten kan behöva mättnadskolonner av typen vätska/vätska eller vätska/fast ämne (till exempel kolonner med glasull) (19). Även om det också kan vara möjligt att dosera mycket hydrofoba testkemikalier via fodret, finns det inte särskilt mycket erfarenhet av att använda det exponeringssättet i detta test.

21. Testlösningar med de valda koncentrationerna bereds genom utspädning av en stamlösning. Stamlösningen bör helst beredas genom att man helt enkelt blandar eller skakar testkemikalien i spädvattnet på mekanisk väg (till exempel genom omrörning och/eller ultraljudsbehandling). Mättnadskolonner/-system eller passiva doseringsmetoder (20) kan användas för att få en stamlösning med lämplig koncentration. Helst bör man använda ett testsystem utan hjälplosningsmedel, men olika testkemikalier har olika fysikalisk-kemiska egenskaper som sannolikt kan kräva olika strategier för beredningen av exponeringslösningen med kemikalien. Man bör på alla sätt försöka undvika lösningsmedel eller bärämnen, av följande skäl: 1) vissa lösningsmedel kan i sig själva medföra toxicitet och/eller oönskad eller oväntad respons, 2) testkemikalier i koncentrationer som ligger över kemikaliernas vattenlöslighet (vilket ofta kan vara fallet vid användning av lösningsmedel) kan leda till felaktigt fastställande av effektiva koncentrationer, 3) användning av lösningsmedel i längre tester kan leda till en betydande grad av ”biofilmbildning” kopplad till mikrobiell aktivitet, vilket kan påverka såväl miljöförhållandena som förmågan att upprätthålla korrekta exponeringskoncentrationer och 4) i avsaknad av historiska data som styrker att lösningsmedlet inte påverkar studiens resultat, krävs vid användning av lösningsmedel en kontrollgrupp med lösningsmedel vilket får betydande konsekvenser ur ett djurskyddsperspektiv eftersom ytterligare djur krävs för testets utförande. För kemikalier som är svåra att testa kan ett lösningsmedel användas som en sista utväg, och OECD:s vägledande dokument om akvatisk toxicitetstestning av svåra ämnen och blandningar (OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures) (21) bör rådfrågas för att fastställa vilken metod som passar bäst. Valet av lösningsmedel ska avgöras av testkemikaliens kemiska egenskaper och av tillgången till historiska kontrolldata gällande lösningsmedlet. Om historiska data saknas ska lämpligheten hos ett lösningsmedel avgöras innan den slutgiltiga studien genomförs. Om det inte går att undvika att använda ett lösningsmedel och mikrobiell aktivitet uppkommer (biofilm bildas), rekommenderas det att registrera/rapportera bildandet av biofilm för varje akvarium (åtminstone en gång i veckan) under hela testet. Helst bör lösningsmedelskoncentrationen hållas konstant för lösningsmedelskontrollen (kontrollgruppen med lösningsmedel) och alla testbehandlingar. Om lösningsmedelskoncentrationen inte hålls konstant bör den högsta lösningsmedelskoncentrationen i testbehandlingen användas för lösningsmedelskontrollen.

I fall där ett lösningsmedel används som bärämne bör den maximala lösningsmedelskoncentrationen inte överskrida 100 µl/l eller 100 mg/l (21) och det rekommenderas att lösningsmedelskoncentrationen hålls så låg som möjligt (till exempel < 20 µl/l) för att undvika potentiell påverkan från lösningsmedlet på de uppmätta endpoint-värdena (22).

Försöksdjur

Art som används för testet

22. Arten som används för testet är *Xenopus laevis*, av följande skäl: 1) arten odlas rutinmässigt i laboratorier över hela världen, 2) den går lätt att få tag på genom kommersiella leverantörer och 3) det går att fastställa individernas genetiska kön.

Skötsel och avel av vuxna djur

23. Korrekt skötsel av och lämpliga avelsmetoder för *Xenopus laevis* beskrivs i en standardiserad riktlinje (23). Förvar och omvårdnad av *Xenopus laevis* beskrivs även av Read (24). För att framkalla parning injiceras tre till fem par av vuxna honor och hanar intraperitonealt med humant koriongonadotropin (hCG). Hon- och hanexemplar injiceras med exempelvis cirka 800–1 000 IU respektive 500–800 IU hCG upplöst i en saltlösning på 0,6–0,9 % (eller Ringers lösning för grodor, som är en fysiologisk koksaltlösning för groddjur, www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html). Injektionsvolymerna ska vara runt 10 µl/g kroppsvikt (~1 000 µl). Därefter hålls avelsparen för vilka parning har framkallats i stora akvarier, där de är ostörda och under stabila förhållanden för att uppmuntra till amplexus. Varje avelsakvarium bör ha en falsk botten i form av ett nät av rostfritt stål (med öppningar på exempelvis 1,25 cm) som gör att äggen kan sjunka till akvariets botten. Grodor som injicerats med hCG sent på eftermiddagen kommer normalt att lägga större delen av sina ägg på förmiddagen dagen därpå. Efter att en tillräcklig mängd ägg har lagts och befruktats bör de vuxna djuren avlägsnas från avelsakvarierna. Äggen samlas därefter in och de geléaktiga höljena tas bort genom behandling med L-cystein (23). En L-cysteinlösning på 2 % ska beredas och pH-värdet ska justeras till 8,1 med 1 M NaOH. Lösningen, som ska ha en temperatur på 21 °C, tillsätts till en E-kolv på 500 ml som innehåller äggen från ett visst lektillfälle och kolven roteras försiktigt under en till två minuter, varefter äggen sköljs noggrant 6–8 gånger med odlingsvatten som håller temperaturen 21 °C. Äggen överförs därefter till en kristalliseringsskål och det kontrolleras att de är > 70 % livskraftiga med minimalt med avvikelser eller missbildningar i de embryon som uppvisar celldelning.

TESTETS UTFORMNING

Testkoncentrationer

24. Det rekommenderas att man använder minst fyra kemikaliekoncentrationer och lämpliga kontrollgrupper (inklusive kontrollgrupper med lösningsmedel vid behov). Generellt sett rekommenderas en koncentrationsseparation (avståndsfaktor) som inte överskrider 3,2.
25. Vid tillämpningen av det här testet bör resultat från befintliga groddjursstudier användas, i den mån det är möjligt, för att fastställa den högsta testkoncentrationen, så att koncentrationer som är uppenbart toxiska kan undvikas. Information från exempelvis kvantitativa struktur-aktivitetssamband, jämförelser med liknande ämnen och data från befintliga groddjursstudier, som testet på groddjursmetamorfos (testmetod C.38 [25]) och testet gällande fosterskador hos grodor – *Xenopus* (23), och/eller fisktester som testmetoderna C.48, C.41 och C.49 (26) (27) (28) kan bidra till fastställandet av denna koncentration. Innan LAGDA-testet utförs kan ett preliminärt test för att hitta rätt koncentrationsintervall genomföras. Det rekommenderas att exponeringen vid ett sådant preliminärt test startar inom 24 timmar från befruktningen och fortsätter under 7–14 dygn (eller längre tid vid behov) och testkoncentrationerna bör väljas så att intervallen mellan testkoncentrationerna inte är större än en faktor 10. Resultaten från det preliminära testet för att hitta rätt koncentrationsintervall bör användas för att fastställa den högsta testkoncentrationen i LAGDA-testet. Observera att om ett lösningsmedel måste användas ska lösningsmedlets lämplighet (det vill säga huruvida det kan ha en påverkan på studiens resultat) fastställas som en del av det preliminära testet för att hitta rätt koncentrationsintervall.

Replikat inom behandlingsgrupper och kontrollgrupper

26. Minst fyra replikatakvarier per testkoncentration och minst åtta replikat för kontrollgruppen (och kontrollgruppen med lösningsmedel, vid behov) ska användas (det vill säga antalet replikat i kontrollgruppen och i kontrollgruppen med lösningsmedel, om sådan används, ska vara dubbelt så många som antalet replikat för varje behandlingsgrupp, för att säkerställa en tillräcklig statistisk säkerhet). Varje replikat ska innehålla maximalt 20 djur. Det minsta antalet djur som används är 15 (5 för delprovtagningen i NF-stadium 62 och 10 juvenila grodor). Varje replikat bör dock även ha några extra djur, för att det ska finnas en marginal vid eventuella dödsfall så att det kritiska antalet 15 kan upprätthållas.

FÖRFARANDE

Översikt över testet

27. Testet startas med nylagda embryon (NF-stadium 8–10) och fortsätter in i den juvenila fasen. Djuren undersöks dagligen, så att eventuella dödsfall och tecken på onormalt beteende upptäcks. I NF-stadium 62 samlas ett delprov av yngel (upp till fem djur per replikat) in och olika endpoints undersöks (se tabell 1). När alla djuren har nått NF-stadium 66, det vill säga vid slutförd metamorfos (eller efter 70 dagar från testets start, beroende på

vilket som inträffar först), görs en slumpvis gallring (men utan delprovtagning) för att minska antalet djur (tio per akvarium) (se punkt 43) och för de kvarvarande djuren fortsätter exponeringen till 10 veckor efter mediantiden för NF-stadium 62 i kontrollgruppen. Vid testets slut (provtagning på juvenila grodor) görs ytterligare mätningar (se tabell 1).

Exponeringsförhållanden

28. En komplett sammanställning av testparametrarna finns i tillägg 3. Under exponeringsperioden bör testlösningarnas koncentration av upplöst syre, temperatur och pH-värde mätas dagligen. Konduktivitet, alkalinitet och hårdhet mäts en gång i månaden. Vad gäller testlösningarnas vattentemperatur ska skillnaderna mellan olika replikat och olika behandlingar (inom en och samma dag) inte överskrida 1,0 °C. I fråga om pH-värdet för testlösningar ska skillnaderna mellan olika replikat och olika behandlingar inte överskrida 0,5.
29. Exponeringsakvarierna kan sugas ur dagligen så att okonsumerat foder och avfallsprodukter avlägsnas, men försiktighet bör iakttas så att akvarierna inte korskontamineras. Var noga med att inte utsätta djuren för onödig stress och onödiga trauman, särskilt under förflyttning, rengöring av akvarierna och hantering. Stressande förhållanden/händelser bör undvikas, till exempel starka och/eller ihållande ljud, knackningar på akvarierna eller vibrationer i akvarierna.

Exponeringstiden för testkemikalien

30. Exponeringen startas med nylagda embryon (NF-stadium 8–10) och fortsätter fram till tio veckor efter mediantiden för NF-stadium 62 (≤ 45 dygn från testets start) i kontrollgruppen. I allmänhet är LAGDA-testets längd 16 veckor (maximalt 17 veckor).

Testets start

31. Föräldradjuren som används för att inleda testet ska tidigare ha visat sig kunna producera avkomma som går att könsbestämma genetiskt (se tillägg 5). Efter att de vuxna djuren har lekt ska embryona samlas in, behandlas med cystein så att de geléaktiga höljena avlägsnas och undersökas med avseende på viabilitet (23). Cysteinbehandlingen gör att embryona kan hanteras utan att fastna på olika ytor under undersökningen. Undersökningen äger rum under ett dissektionsmikroskop med användning av en pasteurpipett av lämplig storlek för avlägsnande av ej levnadsdugliga embryon. Helst bör en och samma äggläggning som resulterar i över 70 % viabilitet användas för testet. Embryon i NF-stadierna 8–10 fördelas slumpvis till exponeringsakvarier som innehåller en lämplig volym spädvatten, till dess att alla akvarier innehåller 20 embryon. Embryona bör hanteras varsamt under denna överföring, för att minimera hanteringsstressen och för att undvika skador på embryona.

Vid 96 timmar efter befruktningen ska ynglen ha rört sig uppför vattenpelaren och börjat klänga sig fast vid akvariets kanter.

Utfodringsprogram

32. Förändringar av fodret och utfodringsmängden under de olika levnadsstadierna för *Xenopus laevis* är en mycket viktig aspekt av LAGDA-testprotokollet. Alltför omfattande utfodring under yngelfasen leder normalt till ökat antal fall av och allvarigare grad av skolios (se tillägg 8) och bör undvikas. Omvänt leder otillräcklig utfodring under yngelfasen till mycket varierande utvecklingstakter hos kontrollgrupperna, vilket potentiellt kan påverka den statistiska säkerheten eller skapa oklara testresultat. I tillägg 4 anges det rekommenderade fodret för yngel och juvenila grodor och utfodringsprogram för *Xenopus laevis* under genomflödesförhållanden, men alternativa lösningar kan tillåtas förutsatt att testorganismerna växer och utvecklas på ett tillfredsställande sätt. Det är viktigt att notera att om endokrinspecifika endpoints ska mätas, ska fodret vara fritt från hormonellt verkande ämnen som sojamjöl.

Utfodring av yngel

33. Den rekommenderade foderblandningen för yngel utgörs av startfoder för öring, *Spirulina*-algflingor och guldfiskflingor (till exempel TetraFin®-flingor, Tetra, Tyskland) som blandas samman i odlingsvatten (eller spädvatten). Blandningen ges tre gånger om dagen på vardagar och en gång om dagen på helgen. Yngel utfodras även med levande, 24 timmar gamla naupliuslarver av saltkräfta, *Artemia* spp., två gånger om dagen på vardagar och en gång om dagen på helgen från och med dag 8 efter befruktningen. Utfodringen av ynglen, som ska vara densamma för alla testkärl, ska skapa förutsättningar för lämplig tillväxt och utveckling av försöksdjuren, för att säkerställa reproducerbarhet och överförbarhet av testresultaten, enligt följande: 1) mediantiden till NF-stadium 62 i kontrollgrupperna ska vara ≤ 45 dygn, och 2) en genomsnittlig vikt på $1,0 \pm 0,2$ g rekommenderas i kontrollgrupperna vid NF-stadium 62.

Utfodring av juvenila grodor

34. Så snart metamorfosen är klar utgörs utfodringen av sjunkande grodfoder av god kvalitet, till exempel Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, Florida, Förenta staterna) (se tillägg 4). För grodor som precis har genomgått metamorfosen (tidigt i fasen som juvenila grodor) ska pelletarna köras lite snabbt i en kaffekvarn eller mixer, eller krossas med mortelstöt i en mortel, så att storleken minskar. Så snart de juvenila grodorna är stora nog att äta hela pelletar behövs inte längre någon malning eller krossning. Djuren ska utfodras en gång om dagen. Utfodringen av de juvenila grodorna ska skapa förutsättningar för lämplig tillväxt och utveckling av organismerna: en genomsnittlig vikt på $11,5 \pm 3$ g rekommenderas för de juvenila grodorna i kontrollgruppen vid testets slut.

Analytisk kemi

35. Innan testet påbörjas ska testkemikaliens stabilitet (till exempel löslighet, nedbrytbarhet och flyktighet) fastställas, liksom alla analysmetoder som kan komma att behövas, till exempel med användning av befintlig information eller kunskap. När doseringen sker via spädvattnet rekommenderas det att testlösningar från varje koncentration hos replikatakvarierna analyseras innan testet inleds, för att verifiera systemets prestanda. Under exponeringsperioden fastställs koncentrationerna av testkemikalien med lämpliga intervall, helst varje vecka för åtminstone ett replikat i varje behandlingsgrupp, med rotering mellan replikaten i samma behandlingsgrupp varje vecka. Det rekommenderas att resultaten baseras på de uppmätta koncentrationerna. Om koncentrationen av testkemikalien i lösningen på ett tillfredsställande sätt har hållits inom $\pm 20\%$ av den nominella koncentrationen under hela testet, kan dock resultaten baseras antingen på nominella eller på uppmätta värden. Dessutom ska variationskoefficienten för de uppmätta testkoncentrationerna inom en behandling, sett till hela testperioden, hållas inom 20% för varje enskild koncentration. När de uppmätta koncentrationerna inte håller sig inom $80\text{--}120\%$ av den nominella koncentrationen (till exempel vid test av kemikalier som är kraftigt biologiskt nedbrytbara eller adsorptiva), ska de effektiva koncentrationerna fastställas och uttryckas i förhållande till den genomsnittliga koncentrationen för genomflödestest.
36. Flödeshastigheterna för spädvattnet och stamlösningen bör kontrolleras med lämpliga intervall (till exempel tre gånger i veckan) under hela exponeringstiden. När det rör sig om kemikalier som inte kan detekteras vid vissa eller samtliga av de nominella koncentrationerna (till exempel till följd av snabb nedbrytning eller adsorption i testkärnen, eller omfattande ackumulering av kemikalien i kropparna på de exponerade djuren) rekommenderas det att testlösningens förnyelsetakt i varje kammare anpassas så att testkoncentrationerna kan hållas så konstanta som möjligt.

Observationer och endpoint-mätningar

37. De endpoints som utvärderas under exponeringens förlopp är sådana endpoints som tyder på toxicitet, däribland dödlighet, onormalt beteende i form av exempelvis kliniska tecken på sjukdom och/eller allmän toxicitet, samt tillväxtmått (längd och vikt), liksom patologiska endpoints som kan vara tecken både på allmän toxicitet och på hormonella verkningsmekanismer med fokus på östrogen-, androgen- eller sköldkörtelmedierade processer. Därtill kan VTG-koncentrationen i plasma mätas vid testets slut, om så önskas. Mätning av VTG kan vara användbart för att förstå testresultaten mot bakgrund av endokrina mekanismer för misstänkta hormonstörande ämnen. Testets endpoints och tidpunkten för mätningarna sammanfattas i tabell 1.

Tabell 1: Endpoint-översikt för LAGDA-testet

Endpoints*	Varje dag	Mellanliggande provtagning (provtagning på yngel)	Vid testets slut (provtagning på juvenila grodor)
Dödsfall och missbildningar	X		
Tid till NF-stadium 62		X	
Histologi/histopatologi (sköldkörtel)		X	
Morfometrisk mätning (tillväxt i vikt och längd)		X	X
Leversomatiskt index (LSI)			X
Genetiska/fenotypiska könsfördelningar			X
Histopatologi (gonader, äggledare eller sädesledare, njure och lever)			X
Vitellogenin (VTG) (valfritt)			X

* Alla endpoints analyseras statistiskt.

Dödlighet och dagliga observationer

38. Alla testakvarier bör dagligen kontrolleras för förekomst av döda djur och antalet dödsfall ska registreras för varje akvarium. Döda djur ska avlägsnas från testakvariet så snart de har upptäckts. De döda djurens utvecklingsstadium bör kategoriseras som antingen före NF-stadium 58 (innan frambenen framträder), NF-stadium 58 till NF-stadium 62, NF-stadium 63 till NF-stadium 66 (mellan NF-stadium 62 och fullständig resorption av svansen) eller efter NF-stadium 66 (efter yngelstadiet). En dödlighet som överstiger 20 % kan vara ett tecken på olämpliga testbetingelser eller på uppenbart toxiska effekter hos testkemikalien. Djuren tenderar att löpa störst risk för ej kemikalieorsakade dödsfall under de första dagarnas utveckling efter leken och under metamorfosens klimax. Sådana dödsfall kan synas i kontrollgruppens data.
39. Därtill bör eventuella observationer av onormalt beteende, mycket synliga missbildningar (till exempel skolios) eller lesioner registreras. Observationer av skolios ska räknas (frekvens) och graderas utifrån allvarlighetsgrad (till exempel: ej påfallande – EP, minimal – 1, måttlig – 2, allvarlig – 3, se tillägg 8). Ansträngningar bör göras för att säkerställa att prevalensen av måttlig och allvarlig skolios begränsas (till exempel till under 10 % i kontrollgrupperna) genom hela testet, även om en mer omfattande förekomst av missbildningar i kontrollgrupperna inte nödvändigtvis är en anledning att avbryta testet. Normalt beteende för yngel är att de simmar fritt i vattenpelaren med svansen något högre än huvudet och med regelbundna rytmiska slag med svansen, att de periodvis stiger till ytan, att de rör på gällocken när de andas och att de reagerar på stimulus. Onormalt

beteende kan till exempel vara att ynglen flyter på ytan, ligger på botten av akvariet, simmar upp och ned eller med ojämna rörelser, inte går upp till ytan eller inte reagerar på stimulus. För djur som har genomgått metamorfos ska, i tillägg till ovanstående onormala beteenden, även stora skillnader i foderkonsumtion mellan olika behandlingar registreras. Till omfattande missbildningar och lesioner kan räknas morfologiska avvikelser (till exempel missbildade armar och ben), blödande lesioner, buködem och bakteriella infektioner eller svampinfektioner, för att bara nämna några. Förekomst av lesioner på huvudet på juvenila grodor, precis bakom näsborrarna, kan vara ett tecken på otillräcklig fuktighetsnivå. Dessa bestämningar är kvalitativa och bör betraktas som motsvarigheter till kliniska tecken på sjukdom eller stress, och ska göras i jämförelse med kontrolldjuren. Om förekomsten är större i exponerade akvarier än i kontrollgrupperna bör detta betraktas som bevis på uppenbar toxicitet.

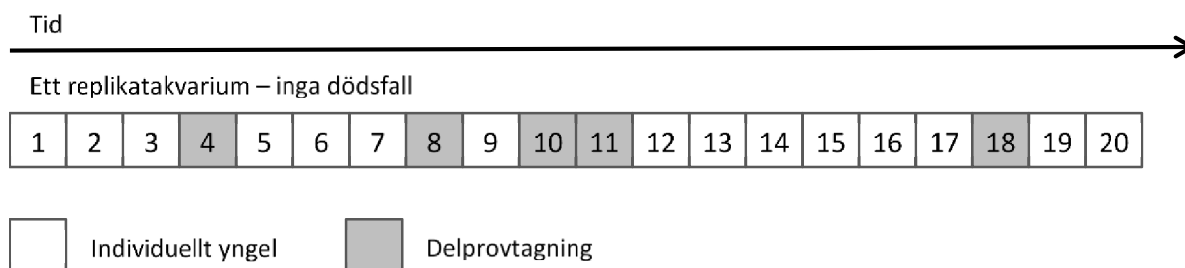
Delprovtagning på yngel

Kortfattad beskrivning av delprovtagningen på yngel

40. Grodyngel som har nått NF-stadium 62 ska avlägsnas från akvarierna och antingen användas för provtagning eller förflyttas till nästa del av exponeringen i ett nytt akvarium, alternativt separeras fysiskt från de kvarvarande grodynglen i samma akvarium med en avskiljande vägg. Grodynglen kontrolleras dagligen och den dag i testet då ett enskilt grodyngel når NF-stadium 62 registreras. Den definierande egenskap som ska användas för denna bedömning är formen på huvudet. Så snart huvudet har minskat i storlek så att det visuellt sett har ungefär samma bredd som ynglets bål och framben, mätt i nivå med hjärtats mitt, ska individen anses ha uppnått NF-stadium 62.
41. Målet är att utföra provtagning på totalt fem grodyngel i NF-stadium 62 per replikatakvarium. Urvalet ska göras helt slumpvis, men bestämmas *a priori*. Ett hypotetiskt exempel för ett replikatakvarium finns i **figur 1**. Om det skulle finnas 20 överlevande grodyngel i ett visst akvarium när den första individen når NF-stadium 62, ska fem slumpvisa nummer väljas mellan 1 och 20. Grodyngel nr 1 är den första individen att nå NF-stadium 62 och grodyngel nr 20 är den sista individen i ett akvarium att nå NF-stadium 62. Om det i stället är 18 överlevande yngel i ett akvarium, ska fem slumpvisa nummer väljas mellan 1 och 18. Detta ska göras för varje replikatakvarium när den första individen i testet når NF-stadium 62. Om det sker dödsfall under den tid som provtagningen i NF-stadium 62 pågår, måste de kvarvarande proven slumpas på nytt baserat på hur många yngel < NF-stadium 62 som finns kvar och hur många fler prov som behövs för att uppnå totalt fem prov från detta replikat. Den dag då ett grodyngel når NF-stadium 62 ska det kontrolleras i det förberedda provtagningsschemat huruvida denna individ ska användas för provtagning eller fysiskt separeras från de kvarvarande grodynglen för fortsatt exponering. I exemplet som tillhandahålls här (figur 1) separeras den första individen att nå NF-

stadium 62 (det vill säga ruta 1) fysiskt från de andra ynglen och utsätts för fortsatt exponering, och den testdag på vilken denna individ nådde NF-stadium 62 registreras. Därefter behandlas individerna nr 2 och nr 3 på samma sätt som nr 1, varpå individ nr 4 används för provtagning avseende tillväxt och sköldkörtelns histologi (enligt detta exempel). Detta förfarande fortsätter till dess att den 20:e individen antingen förenas med resten av individerna som passerat NF-stadium 62 eller används för provtagning. Det slumpmässiga förfarande som används måste ge varje enskild organism i testet samma möjlighet att väljas ut. Detta kan uppnås med användning av valfri randomiseringsmetod, men det kräver även att varje grodyngel fångas in med håv vid någon tidpunkt under delprovtagningsperioden vid NF-stadium 62.

Figur 1: Hypotetiskt exempel på schema för provtagningen vid NF-stadium 62 för ett visst replikatakvarium



42. För delprovtagningen på yngel är de erhållna endpoint-värdena: 1) tid till NF-stadium 62 (det vill säga antalet dagar mellan befruktningen och NF-stadium 62), 2) yttre avvikelser, 3) morfometrisk mätning (till exempel vikt och längd) och 4) sköldkörtelns histologi.

Skonsam avlivning av grodyngel

43. De grodyngel som ska användas för delprovtagningen i NF-stadium 62 (fem individer per replikat) ska avlivas genom nedsänkning under 30 minuter i lämplig mängd (till exempel 500 ml) bedövningslösning (till exempel 0,3-procentig lösning av MS-222, trikainmetansulfonat, CAS-nr 886-86-2). MS-222-lösningen ska buffras med natriumvätekarbonat till ett pH-värde på cirka 7,0 eftersom obuffrad MS-222-lösning är sur och irriterande för grodskinn, vilket leder till dålig absorbering och onödig extra stress för organismerna.
44. Med hjälp av en håv fiskas ett grodyngel upp ur testkammaren och förs över till (läggs ned i) avlivningslösningen. Djuret är korrekt avlivat och redo för obduktion när det inte längre reagerar på yttre stimulus, till exempel nyp i bakbenen med en tång.

Morfometrisk mätning (vikt och längd)

45. Mätningar av våtvikt (närmaste mg) och längd från nos till kloak (SVL, snout-to-vent length) (närmaste 0,1 mm) för varje grodyngel ska utföras omedelbart efter att djuret blir icke-responsivt av bedövningen (figur 2a). Programvara för bildanalys kan användas för att mäta SVL från ett fotografi. Grodyngel bör torkas av före vägningen för att avlägsna vatten från ynglet. Efter mätning av kroppsstorleken (vikt och SVL) ska eventuella makroskopiska morfologiska avvikelser och/eller kliniska tecken på toxicitet, som skolios (se tillägg 8), petekier och blödningar, registreras eller noteras, varvid digital dokumentation rekommenderas. Observera att petekier är små röda eller lilafärgade blödningar i hudkapillärer.

Insamling och fixering av vävnad

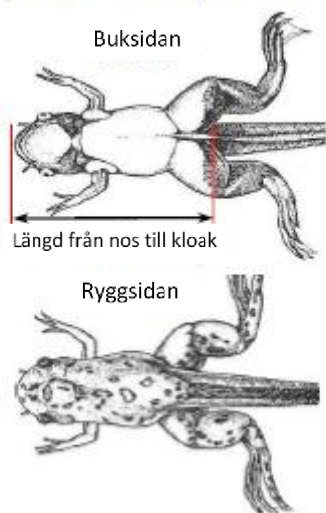
46. För delprov på yngel ska en histologisk bedömning göras av sköldkörtlarna. Den nedre delen av torson bakom frambenen avlägsnas och kasseras. Den kapade kroppen fixeras sedan med Davidsons fixativ. Fixativets volym i behållaren ska vara minst tio gånger större än den uppskattade vävnadsvolymen. Lämplig omrörning eller cirkulation av fixativet bör åstadkommas för att erhålla en tillfredsställande fixering av de aktuella vävnaderna. Alla vävnader ska förbli i Davidsons fixativ under minst 48 timmar, men inte längre än 96 timmar, varefter de sköljs i avjoniserat vatten och förvaras i 10-procentigt neutralt buffrat formalin (1) (29).

Histologisk bedömning av sköldkörtlarna

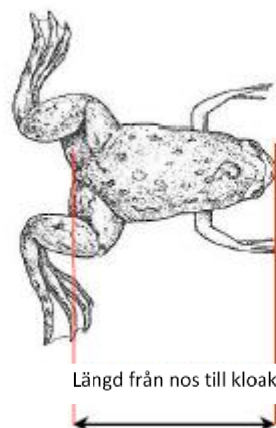
47. Varje delprov på yngel (i form av fixerade vävnader) ska genomgå en histologisk bedömning av sköldkörtlarna, det vill säga en diagnos ställs och en allvarlighetsgradering görs (29) (30).

Figur 2: Mätpunkter för mätning av SVL (längden från nos till kloak) för LAGDA-testet i NF-stadium 62 (a) och för juvenila grodor (b). De definierande egenskaperna för NF-stadium 62 (a): huvudet har samma bredd som bålen, luktnervens längd är kortare än luktbulbens diameter (ryggsidan) och frambenen är i nivå med hjärtat (baksidan). Bilderna är hämtade från Nieuwkoop och Faber (1994) och anpassade.

a. Delprovtagning på yngel (NF-stadium 62)



b. Provtagning på juvenil groda



Yngelexponeringens slut

48. Med tanke på det inledande antalet grodyngel kan det förväntas att en liten procentandel av individerna sannolikt inte kommer att utvecklas normalt och inte slutför metamorfosen (NF-stadium 66) inom en rimlig tid. Exponeringen under yngelstadiet ska inte överskrida 70 dygn. Eventuella grodyngel som är kvar vid slutet av denna period ska avlivas (se punkt 43), deras våtvikt och SVL mätas, deras stadium fastställas enligt Nieuwkoop och Faber (1994) och eventuella avvikelser i utvecklingen registreras.

Gallring efter NF-stadium 66

49. Tio individer per akvarium ska finnas kvar från NF-stadium 66 (fullständig resorption av svansen) till exponeringens slut. Det innebär att efter det att alla djur har uppnått NF-stadium 66 eller efter 70 dygn (beroende på vilket som inträffar först) ska en gallring genomföras. De djur som har passerat NF-stadium 66 och som inte ska fortsätta exponeringen ska väljas ut slumpvis.
50. De djur som inte har valts för fortsatt exponering avlivas (se punkt 43). Mätningar av utvecklingsstadium, våtvikt och SVL (figur 2b) och en obduktion genomförs för varje enskilt djur. Det fenotypiska könet (baserat på gonadernas morfologi) registreras som hona, hane eller obestämt.

Provtagning på juvenila grodor

Kortfattad beskrivning av provtagning på juvenila grodor

51. De kvarvarande djuren fortsätter att exponeras till 10 veckor efter mediantiden för NF-stadium 62 i kontrollgruppen med spädvatten (och/eller kontrollgruppen med

lösningsmedel, om detta är relevant). I slutet av exponeringsperioden ska de kvarvarande djuren (maximalt tio grodor per replikat) avlivas och de olika endpoint-värdena mätas eller utvärderas och registreras: 1) morfometrisk mätning (vikt och längd), 2) fenotypiska/genotypiska könsfördelningar, 3) levervikt (leversomatiskt index), 4) histopatologi (gonader, äggledare eller sädesledare, lever och njure) och, om så önskas, 5) VTG i plasma.

Skonsam avlivning av grodor

52. De juvenila grodor från vilka proverna ska tas, det vill säga grodorna som har genomgått metamorfosen, avlivas genom en intraperitoneal injektion med bedövningsmedel, till exempel 10-procentig MS-222 i en lämplig fosfatbuffrad lösning. Prover kan tas från grodorna när de inte längre reagerar på stimulus (vilket vanligtvis är cirka två minuter efter injiceringen om 10-procentig MS-222 används i en dos på 0,01 ml per g groda). Även om juvenila grodor kan sänkas ned i en högre koncentration av bedövningsmedel (MS-222), har erfarenheten visat att det tar längre tid för dem att bedövas med denna metod och det är svårt att veta hur lång tid de måste vara nedsänkta innan provtagning. Injicering ger en snabb och effektiv avlivning inför provtagningen. Provtagningen ska inte påbörjas förrän grodans brist på respons har bekräftats, för att säkerställa att djuret verkligen är dött. Om grodor visar tecken på avsevärt lidande (på en mycket allvarlig nivå där grodans död kan förutsägas med tillförlitlighet) och kan betraktas som döende, ska djuren bedövas och avlivas och behandlas som dödsfall vid dataanalysen. När en groda avlivas på grund av sjukdom ska detta registreras och rapporteras. Beroende på när grodan avlivas under studien kan grodan bevaras för histopatologisk analys (grodan fixeras för eventuell histopatologisk undersökning).

Morfometrisk mätning (vikt och längd)

53. Mätningarna av våtvikt och SVL (figur 2b) är identiska med de som beskrivs för delprovtagningen på yngel.

VTG i plasma (valfritt)

54. VTG är en allmänt accepterad biomarkör som uppkommer vid exponering för östrogenkemikalier. Inom LAGDA-testet kan VTG i plasman mätas för de juvenila grodor som ingår i provtagningen (detta kan i synnerhet vara relevant om testkemikalien misstänks vara en östrogen).
55. De bakre benen på den avlivade juvenila grodan skärs av och blod samlas in med ett hepariniserat kapillärrör (även om andra blodinsamlingsmetoder, till exempel hjärtpunktering, också kan vara lämpliga). Blodet förs över till ett mikrocentrifugrör (till exempel med volymen 1,5 ml) och centrifugeras så att plasma erhålls. Plasmaproverna bör lagras vid -70°C eller lägre tills det är dags att fastställa VTG-värdet. VTG-

koncentrationen i plasman kan mätas med en enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) (se tillägg 6) eller genom en alternativ metod som exempelvis masspektrometri (31). Artspecifika antikroppar är att föredra till följd av en högre sensitivitet.

Fastställande av genetiskt kön

56. Det genetiska könet för varje juvenil groda bedöms baserat på de markörer som har utvecklats av Yoshimoto m.fl. (11). För att fastställa det genetiska könet samlas en del av ett av bakbenen (eller hela bakbenet, alternativt någon annan vävnad) som har tagits bort under dissektionen in och läggs i ett mikrocentrifugrör (vävnadsprover från grodor kan erhållas från valfri vävnad). Vävnaden kan lagras vid -20°C eller lägre tills det är dags att isolera DNA (deoxiribonukleinsyra). Isoleringen av DNA från vävnader kan göras med kommersiellt tillgänglig utrustning och analysen av markörens förekomst eller frånvaro görs via en PCR-metod (polymeraskedjereaktion) (se tillägg 5). Generellt sett är överensstämmelsen mellan det histologiskt bestämda könet och genotypen över 95 % för djuren i kontrollgrupperna vid tidpunkten för provtagning på juvenila grodor.

Insamling av vävnad och fixering för histopatologi

57. Gonader, äggledare eller sädesledare, njurar och lever samlas in för histologisk analys under den slutliga provtagningen. Först öppnas bukhålan och levern dissekeras ut och vägs. Därefter avlägsnas matsmältningsorganen (till exempel mage och tarmar) försiktigt från den nedre delen av buken så att gonader, njurar och äggledare eller sädesledare blottläggs. Eventuella makroskopiska morfologiska avvikelser i gonaderna ska noteras. Slutligen ska bakbenen avlägsnas, om de inte redan tidigare har avlägsnats för blodinsamling. Den insamlade levern och kroppen med gonaderna kvar på plats ska omedelbart placeras i Davidsons fixativ. Fixativets volym i behållaren ska vara minst tio gånger större än den uppskattade vävnadsvolymen. Alla vävnader ska förbli i Davidsons fixativ under minst 48 timmar, men inte längre än 96 timmar, varefter de sköljs i avjoniserat vatten och förvaras i 10-procentigt neutralt buffrat formalin (1) (29).

Histopatologi

58. Varje juvenil groda som ingår i provtagningen bedöms histologiskt med avseende på patologiska förändringar i gonader, äggledare eller sädesledare, njurar och levervävnad, det vill säga en diagnos ställs och en allvarlighetsgradering görs (32). Den gonadbaserade fenotypen bestäms också utifrån denna bedömning (till exempel äggstockar, testiklar, intersexuell) och tillsammans med individuella mätningar av det genetiska könet kan dessa observationer användas för att beräkna de fenotypiska/genotypiska könsfördelningarna.

RAPPORTERING AV UPPGIFTER

Statistisk analys

59. LAGDA-testet genererar tre typer av data som kan analyseras statistiskt: 1) kvantitativa kontinuerliga data (vikt, SVL, LSI och VTG), 2) tid-till-händelse-data avseende utvecklingstakt (det vill säga dagar till NF-stadium 62 från testets start) och 3) ordinaldata i form av allvarlighetsgrader eller utvecklingsstadier från histopatologiska bedömningar.
60. Testets utformning och urvalet av statistiska tester bör ge en tillräcklig statistisk säkerhet för att förändringar av biologisk betydelse i endpoint-värden ska kunna upptäckas när en nolleffektkoncentration (NOEC) eller ett EC_x-värde ska rapporteras. Statistiska analyser av data (i allmänhet baserade på replikatgenomsnitt) bör helst följa de förfaranden som beskrivs i dokumentet *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (33). I tillägg 7 till denna testmetod anges det rekommenderade beslutsträdet för den statistiska analysen och där finns även vägledning för databehandlingen och för valet av det mest lämpade statistiska testet eller den mest lämpade statistiska modellen att använda i samband med LAGDA-testet.
61. Data från provtagningen på juvenila grodor (till exempel tillväxt och LSI) ska analyseras separat för varje genotypiskt kön, eftersom genotypiskt kön fastställs för alla grodor.

Överväganden för dataanalys

Användning av replikat och behandlingar som förlorat sin giltighet

62. Replikat och behandlingar kan förlora sin giltighet till följd av alltför hög dödlighet orsakad av uppenbar toxicitet, sjukdomar eller tekniska fel. Om en behandling förlorar sin giltighet till följd av sjukdom eller tekniskt fel, bör det finnas tre giltiga behandlingar med tre giltiga replikat tillgängliga för analys. Om uppenbar toxicitet förekommer i behandlingen/behandlingarna med högst koncentration, bör helst åtminstone tre behandlingsnivåer med tre giltiga replikat finnas tillgängliga för analys (i enlighet med strategin för högsta tolererade koncentration i OECD:s testriktlinjer [34]). Vid sidan av dödsfall, kan tecken på uppenbar toxicitet exempelvis vara beteendemässig påverkan (till exempel att djuren flyter på ytan, ligger på akvariets botten, simmar upp och ned eller med ojämna rörelser eller inte går upp till ytan), morfologiska lesioner (till exempel blödande lesioner eller buködem) eller en hämning av den normala utfodringsresponsen, vid en kvalitativ jämförelse med kontrolldjuren.

Kontrollgrupp med lösningsmedel

63. I slutet av testet bör en utvärdering göras av lösningsmedlets eventuella effekter (om sådant används). Detta görs genom en statistisk jämförelse mellan kontrollgruppen med lösningsmedel och kontrollgruppen med spädvatten. De endpoints som är mest relevanta att beakta i denna analys är de som gäller tillväxt (vikt och längd), eftersom dessa kan påverkas av en generell toxicitet. Om statistiskt signifikanta skillnader kan påvisas mellan kontrollgruppen med spädvatten och kontrollgruppen med lösningsmedel för dessa

endpoints, ska bästa professionella bedömning användas för att fastställa om testets giltighet har äventyrats. Om de båda kontrollgrupperna skiljer sig åt bör behandlingarna med kemikalieexponering jämföras med kontrollgruppen med lösningsmedel, såvida det inte är väl känt att jämförelse med kontrollgruppen med spädvatten är att föredra. Om det inte finns några statistiskt signifikanta skillnader mellan de båda kontrollgrupperna rekommenderas det att behandlingarna med kemikalieexponering jämförs med kontrollgrupperna som helhet (både kontrollgruppen med lösningsmedel och kontrollgruppen med spädvatten), såvida det inte är väl känt att jämförelse med antingen enbart kontrollgruppen med spädvatten eller enbart kontrollgruppen med lösningsmedel är att föredra.

Testrapport

64. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

- Fysikaliskt tillstånd och, när så är relevant, fysikalisk-kemiska egenskaper.
- Monokomponentämne:

Fysiskt utseende, vattenlöslighet och andra relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

Kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt (inklusive halten organiskt kol i förekommande fall).

- Multikomponentämne, UVCB-ämnen och blandningar:

Karakteriseras så långt det är möjligt genom kemisk identitet (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.

Art som används för testet:

- Vetenskapligt namn, stam (om denna information är tillgänglig), härkomst och metod för insamling av befruktade ägg och efterföljande hantering.
- Förekomst av sklios i tidigare kontrollgrupper för den använda stamkulturen.

Testbetingelser:

- Fotoperiod/-perioder.
- Testets utformning (till exempel testkamrarnas storlek, material och vattenvolym, antalet testkammare och replikat och antalet testorganismer per replikat).

- Metod för beredning av stamlösningar och förnyelsefrekvensen (i förekommande fall bör även solubiliseringsmedlet och dess koncentration anges).
- Metod för dosering av testkemikalien (till exempel pumpar och spädningssystem).
- Metodens återvinningseffektivitet och de nominella testkoncentrationerna, kvantifieringsgränsen, de uppmätta värdenas medelvärden och deras standardavvikelser i testkärlen, samt den metod med vilken dessa erhöles och bevis för att mätningarna hänförs sig till testkemikaliens koncentrationer i en äkta lösning.
- Spädvattnets egenskaper: pH-värde, hårdhet, temperatur, upplöst syre, restklornivåer (om de har uppmätts), total jodhalt, totalt organiskt kol (om det har uppmätts), uppslammade partiklar (om det har uppmätts), testmediets salinitet (om den har uppmätts) och resultatet av eventuella övriga mätningar.
- De nominella testkoncentrationerna, de uppmätta värdenas medelvärden och deras standardavvikelser.
- Vattenkvaliteten i testkärlen, pH-värde, temperatur (daglig mätning) och upplöst syre.
- Detaljerade uppgifter om utfodringen (till exempel typ av foder, källa, hur stor mängd som getts och hur ofta).

Resultat:

- Belägg för att kontrollgrupperna uppfyller giltighetskriterierna.
- Data för kontrollgruppen (plus kontrollgruppen med lösningsmedel när sådan används) och behandlingsgrupperna, enligt följande: observerade dödsfall och missbildningar, tid till NF-stadium 62, bedömning av sköldkörtelns histologi (endast provtagning på yngel), tillväxt (vikt och längd), LSI (endast provtagning på juvenila grodor), genetiska/fenotypiska könsfördelningar (endast provtagning på juvenila grodor), resultat från histopatologisk bedömning av gonader, äggledare eller sädesledare, njure och lever (endast provtagning på juvenila grodor) och VTG i plasma (endast provtagning på juvenila grodor, om sådan undersökning har utförts).
- Använd metod för den statistiska analysen och databehandlingen (använt statistiskt test eller använd statistisk modell).
- Nolleffekt-koncentrationen (NOEC) för varje bedömd respons.
- Lägsta koncentration med observerad effekt (LOEC) för varje bedömd respons (vid $\alpha = 0,05$), EC_x för varje bedömd respons, i förekommande fall, samt konfidensintervallen (till exempel 95 %) och en kurva för den anpassade modell som använts för att beräkna värdet, lutningen för koncentration-respons-kurvan, formeln för regressionsmodellen och de uppskattade modellparametrarna och deras standardfel.

- Eventuella avvikelser från denna testmetod och avvikelser från acceptanskriterierna, samt överväganden kring potentiella konsekvenser för testets resultat.
65. För resultaten av endpoint-mätningar bör medelvärden och deras standardavvikelser (om möjligt på både replikat- och koncentrationsbasis) presenteras.
66. Mediantiden till NF-stadium 62 i kontrollgrupperna bör beräknas och presenteras som genomsnittet för replikatens medianvärden och deras standardavvikelse. På samma sätt bör, för behandlingar, en behandlings medianvärde beräknas och presenteras som genomsnittet för replikatens medianvärden och deras standardavvikelse.

LITTERATUR

- (1) Förenta staternas miljöförvaldmyndighet (EPA, 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 Disruptors. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.
- (3) Nieuwkoop PD och Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, Förenta staterna.
- (4) Kloas W och Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disruptors. 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 och 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 och Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335–340.
- (9) Mikamo K och 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 och 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 och 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 och 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 och 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 och 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 och 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, Förenta staterna.
- (17) Kapitel C.4 i denna bilaga, Bestämning av ”lätt” bionedbrytbarhet.
- (18) Kapitel C.29 i denna bilaga, Lätt bionedbrytbarhet – CO₂ i förslutna kärl (Headspace-test).
- (19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL och 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): 593–599.
- (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), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.
- (22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ och 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, Förenta staterna.
- (24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., s. 84.
- (25) Kapitel C.38 i denna bilaga, Test på groddjursmetamorfos.
- (26) Kapitel C.48 i denna bilaga, Korttidstest av reproduktion hos fisk.
- (27) Kapitel C.41 i denna bilaga, Test på fiskars könsutveckling.
- (28) Kapitel C.49 i denna bilaga, Akut toxicitetstest på fiskembryo (FET).
- (29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 82), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.
- (30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC och Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415–424.
- (31) Luna LG och 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), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), 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), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), 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.

Tillägg 1

DEFINITIONER

Apikal endpoint: orsakar effekter på populationsnivå.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

ELISA: enzymkopplad immunadsorberande analys (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

ECx (koncentration som orsakar x % effekt): den koncentration som orsakar en x-procentig effekt på testorganismerna inom en given exponeringsperiod jämfört med en kontrollgrupp. Till exempel är EC50 en koncentration som beräknas ha en effekt gällande en av testets endpoints för 50 % av en exponerad population under en fastställd exponeringsperiod.

dpf: dagar efter befruktning ("days post fertilization").

Genomflödestest: ett test med ett kontinuerligt flöde av testlösningar genom testsystemet under exponeringens hela varaktighet.

HPG-axel: hypothalamus-hypofys-gonad-axeln.

IUPAC: Internationella kemiunionen (International Union of Pure and Applied Chemistry).

Lägsta koncentration med observerad effekt (LOEC): den lägsta testade koncentration av en testkemikalie vid vilken man kan fastställa att testkemikalien har en statistiskt signifikant effekt (vid $p < 0,05$) jämfört med kontrollgruppen. Alla testkoncentrationer som är högre än LOEC bör även ha skadliga effekter som är lika stora som eller större än de effekter som observeras vid LOEC. Om dessa båda villkor inte är uppfyllda bör en fullständig förklaring ges till hur man har valt LOEC (och därmed NOEC). Närmare vägledning ges i tillägg 7.

Genomsnittlig dödlig koncentration (LC50): den koncentration av en testkemikalie som uppskattas vara dödlig för 50 % av testorganismerna under testperioden.

Nolleffektkoncentration (NOEC): den testkoncentration omedelbart under LOEC som inom en fastställd exponeringsperiod inte framkallar någon statistiskt signifikant effekt ($p < 0,05$) jämfört med kontrollgruppen.

Smiles: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

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

UVCB-ämnen: ämnen med okänd eller varierande sammansättning, komplexa

reaktionsprodukter eller biologiska material.

VTG: vitellogenin är ett fosfolipoglykoprotein, en prekursor till ägguleprotein som normalt förekommer hos sexuellt aktiva honor inom alla äggläggande arter.

Tillägg 2**NÅGRA KEMISKA EGENSKAPER FÖR ETT GODTAGBART SPÄDVATTEN**

Ämne	Gränsvärde för koncentration
Partiklar	5 mg/l
Totalt organiskt kol	2 mg/l
Icke-joniserad ammoniak	1 µg/l
Restklor	10 µg/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska fosforföreningar	50 ng/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller klororganiska föreningar plus polyklorerade bifenyler	50 ng/l
Totalt organiskt klor	25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arsenik	1 µg/l
Krom	1 µg/l
Kobolt	1 µg/l
Koppar	1 µg/l
Järn	1 µg/l
Bly	1 µg/l
Nickel	1 µg/l
Zink	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Kvicksilver	100 ng/l
Silver	100 ng/l

Tillägg 3**TESTBETINGELSER FÖR LAGDA-TESTET**

1. Art som används för testet	<i>Xenopus laevis</i>
2. Testtyp	Kontinuerligt genomflöde
3. Vattentemperatur	Den nominella temperaturen är 21 °C. Medeltemperaturen under hela testets längd ska vara 21 ± 1 °C (skillnaderna mellan olika replikat och olika behandlingar ska inte överskrida 1,0 °C)
4. Belysningstyp	Fluorescerande lampor (brett spektrum) på 600–2 000 lux (lumen/m ²) vid vattenytan
5. Fotoperiod	12 timmars ljus, 12 timmars mörker
6. Testlösningens volym och testkärl (akvarium)	4–10 l (med ett minsta vattendjup på 10–15 cm) Akvarium i glas eller rostfritt stål
7. Volymutbyten av testlösningar	Konstant, med tanke på såväl bevarandet av de biologiska betingelserna som den kemiska exponeringen (till exempel fem byten av akvarievolymen per dygn)
8. Testorganismernas ålder vid testets start	NF-stadium (Nieuwkoop och Faber) 8–10
9. Antal organismer per replikat	20 djur (embryon)/akvarium (replikat) vid exponeringens början och 10 djur (juvenila grodor)/akvarium (replikat) efter NF-stadium 66 och fram till exponeringens slut
10. Antal behandlingar	Minst fyra testkemikaliebehandlingar plus lämplig kontrollgrupp (eller lämpliga kontrollgrupper)
11. Antal replikat per behandling	Fyra replikat per behandling för testkemikalien och åtta replikat för kontrollgruppen (eller kontrollgrupperna)
12. Antal organismer per testkemikaliekoncentration	Minst 80 djur per behandling för testkemikalien och minst 160 djur för kontrollgruppen (eller kontrollgrupperna)
13. Spädvatten	Valfritt vatten som möjliggör normal tillväxt och normal utveckling hos <i>Xenopus laevis</i> (till exempel källvatten eller kolfilterrenat kranvatten)
14. Luftning	Ingen luftning krävs, men luftning av akvarierna kan behövas om nivån av upplöst syre faller under de rekommenderade gränserna och flödet av testlösning maximeras
15. Upplöst syre i testlösning	Upplöst syre: ≥ 40 % av luftmättnadsvärdet eller $\geq 3,5$ mg/l

16. pH-värde för testlösning	6,5–8,5 (skillnaderna mellan olika replikat och olika behandlingar bör inte överstiga 0,5)
17. Testlösningens hårdhet och alkalinitet	10–250 mg CaCO ₃ /l
18. Utfodringsprogram	(Se tillägg 4)
19. Exponeringsperiod	Från NF-stadium 8–10 och fram till tio veckor efter mediantiden för NF-stadium 62 i kontrollgruppen för vatten och/eller lösningsmedel (maximalt 17 veckor)
20. Biologiska endpoints	Dödlighet (och avvikande utseende/missbildningar), tid till NF-stadium 62 (provtagning på yngel), bedömning av sköldkörteln histologi (provtagning på yngel), tillväxt (vikt och längd), leversomatiskt index (provtagning på juvenila grodor), genetiska/fenotypiska könsfördelningar (provtagning på juvenila grodor), histopatologisk bedömning av gonader, äggledare eller sädesledare, njure och lever (provtagning på juvenila grodor) och vitellogenin i plasma (provtagning på juvenila grodor, valfritt)
21. Giltighetskriterier för testet	Upplöst syre ska vara ≥ 40 % av luftmättnadsvärdet, den genomsnittliga vattentemperaturen ska vara 21 ± 1 °C och skillnaderna mellan olika replikat och olika behandlingar ska vara $< 1,0$ °C, pH-värdet för testlösningen ska ligga mellan 6,5 och 8,5, dödligheten i kontrollgruppen ska vara ≤ 20 % i varje enskilt replikat, den genomsnittliga tiden till NF-stadium 62 i kontrollgruppen ska vara ≤ 45 dygn, den genomsnittliga vikten för testorganismerna vid NF-stadium 62 och vid testets slut i kontrollgruppen och kontrollgruppen för lösningsmedel (om sådan används) ska vara $1,0 \pm 0,2$ g respektive $11,5 \pm 3$ g och bevis ska finnas tillgängliga som visar att koncentrationerna av testkemikalien i lösningarna på ett tillfredsställande sätt har hållits inom ± 20 % av de genomsnittliga uppmätta värdena.

Tillägg 4

UTFODRINGSPROGRAM

Det bör noteras att även om detta utfodringsprogram rekommenderas är alternativ tillåtna, förutsatt att testorganismerna växer och utvecklas i en lämplig takt.

Utfodring av yngel

Beredning av foder för yngel

- A. 1:1 (volymförhållande) startfoder för öring: alger/TetraFin® (eller motsvarande), enligt följande:
1. Startfoder för öring: blanda 50 g startfoder för öring (fint granulat eller pulver) och 300 ml lämpligt filtrerat vatten på en hög blandarinställning under 20 sekunder.
 2. Blandning av alger/TetraFin® (eller motsvarande): blanda 12 g *Spirulina*-algflingor och 500 ml filtrerat vatten på en hög blandarinställning under 40 sekunder, blanda 12 g TetraFin® (eller motsvarande) med 500 ml filtrerat vatten och kombinera sedan dessa lösningar för att skapa 1 liter vätska med 12 g/l *Spirulina*-alger och 12 g/l TetraFin® (eller motsvarande).
 3. Kombinera lika stora volymer av blandat startfoder för öring och blandningen av alger/TetraFin® (eller motsvarande).
- B. Havskräfta:

15 ml ägg från havskräfta får kläckas i 1 liter saltvatten (som bereds genom att 20 ml NaCl tillsätts till 1 liter avjoniserat vatten). Efter luftning i 24 timmar vid rumstemperatur under konstant belysning skördas havskräftorna. Havskräftorna tillåts sjunka till botten en kort stund, 30 minuter, genom att luftningen stoppas. Cystor som flyter upp till behållarens yta hålls av och kasseras, varpå kräftorna hålls genom lämpliga filter och filtrerat vatten fylls på till 30 ml.

Utfodringsschema

I tabell 1 anges typen av foder och mängden foder som ska ges under yngelstadierna av exponeringen. Djuren ska matas tre gånger per dygn måndag till fredag och en gång per dygn under helgen.

Tabell 1: Utfodringsprogram för yngel av *Xenopus laevis* under genomflödesförhållanden

Tid* (efter befruktning)	Startfoder för öring: alger/TetraFin® (eller motsvarande)		Havskräfta	
	Vardagar (tre gånger per dygn)	Helg (en gång per dygn)	Vardagar (två gånger per dygn)	Helg (en gång per dygn)
Dag 4–14 (i vecka 0–1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (från dag 8 till dag 15)	0,5 ml (från dag 8 till dag 15)

Vecka 2	0,67 ml	2,4 ml	1 ml (från och med dag 16)	1 ml (från och med dag 16)
Vecka 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Vecka 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Vecka 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
Vecka 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Vecka 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Vecka 8–10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

* Dag 0 definieras som den dag då hCG-injiceringen görs.

Övergång från foder för yngel till foder för juvenila grodor

När ynglen har slutfört sin metamorfos övergår de till en foderblandning för juvenila grodor enligt beskrivningen nedan. När denna övergång sker ska fodret för yngel fasas ut i takt med att fodret för juvenila grodor fasas in. Detta kan åstadkommas genom att man proportionellt minskar fodret för yngel samtidigt som man proportionellt ökar fodret för juvenila grodor allteftersom varje grupp om fem yngel passerar NF-stadium 62 och närmar sig slutet av metamorfosen i NF-stadium 66.

Utfodring av juvenila grodor

Foder för juvenila grodor

Så snart metamorfosen är slutförd (stadium 66) ändras utfodringsprogrammet till enbart sjunkande grodfoder av god kvalitet med storleken 3/32 tum (Xenopus Express™, Florida, Förenta staterna) eller motsvarande.

Beredning av krossade pelletar för övergång från yngel till juvenila grodor

Pelletar av sjunkande grodfoder körs lite snabbt i en kaffekvarn eller mixer, eller krossas med mortelstöt i en mortel, för att minska storleken på pelletarna med ungefär 1/3. Alltför lång malning eller krossning leder till att pelletarna blir pulver, vilket inte rekommenderas.

Utfodringschema

I **tabell 2** anges typen av foder och mängden foder som ska ges under stadierna för juvenila grodor och vuxna djur. Djuren ska utfodras en gång om dagen. Det bör noteras att medan djuren genomgår metamorfosen fortsätter de att få en portion havskräftor, till dess att > 95 % av djuren har slutfört metamorfosen.

Djuren ska inte utfodras den dag då testet avslutas, för att inte utfodringen ska skapa osäkerhet i viktmetningen.

Tabell 2: Utfodringsprogram för juvenila grodor av arten *Xenopus laevis* under genomflödesförhållanden. Det bör noteras att djur som inte har genomgått metamorfosen, inklusive de vars metamorfos har fördröjts av kemikaliebehandlingen, inte kan äta okrossade pelletar.

Tid (veckor efter mediandagen för metamorfos)	Volym krossade pelletar (mg per juvenil groda)	Volym hela pelletar (mg per juvenil groda)
Allteftersom djuren slutför metamorfosen	25	0
Vecka 0–1	25	28
Vecka 2–3	0	110
Vecka 4–5	0	165
Vecka 6–9	0	220

* Den första dagen i vecka 0 är mediandagen för metamorfos för djuren i kontrollgruppen.

Tillägg 5

FASTSTÄLLANDE AV GENETISKT KÖN (GENETISK KÖNSBESTÄMNING)

Metoden för genetisk könsbestämning för *Xenopus laevis* bygger på Yoshimoto m.fl. (2008). Detaljerade förfaranden för genotypningen kan vid behov hämtas från denna publikation. Alternativa metoder (till exempel realtids-PCR [qPCR] med hög genomströmning) kan användas om det anses lämpligt.

Primrar för *Xenopus laevis*

DM-W-markör

Framåtriktad primer: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Bakåtriktad primer: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Positiv kontroll

Framåtriktad primer: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Bakåtriktad primer: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

DNA-rening

Rena DNA:t från muskel- eller hudvävnad med användning av exempelvis Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (katalognr 69506) eller någon liknande produkt, i enlighet med produktens instruktioner. DNA kan elueras från spinnskolonnerna med användning av mindre buffertlösning för att få fram mer koncentrerade prov, om det bedöms nödvändigt för PCR-undersökningen. Observera att DNA är mycket stabilt, så se till att undvika korskontaminering som skulle kunna leda till felaktig bestämning av hanar som honor eller vice versa.

PCR

Ett provprotokoll med användning av JumpStart™ Taq från Sigma anges i **tabell 1**.

Tabell 1: Provprotokoll med användning av JumpStart™ Taq från Sigma

Mastermix	1x (µl)	[Slutlig]
NFW	11	–
10X buffertlösning	2,0	–

MgCl ₂ (25 mM)	2,0	2,5 mM
Deoxinukleosidtrifosfater (dNTP) (10 mM vardera)	0,4	200 µM
Markör, framåtriktad primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Markör, bakåtriktad primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontroll, framåtriktad primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontroll, bakåtriktad primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 enheter/µl
DNA-mall	1,0	~200 pg/µl

Anmärkning: Vid beredning av mastermixar bör extra mix beredas för eventuella förluster som kan ske i samband med pipettering (till exempel bör 25 satser förberedas för enbart 24 reaktioner).

Reaktion:

Mastermix 19,0 µl

Mall 1,0 µl

Totalt 20,0 µl

Termocykler-profil:

Steg 1 94 °C 1 minut

Steg 2 94 °C 30 sekunder

Steg 3 60 °C 30 sekunder

Steg 4 72 °C 1 minut

Steg 5 Gå till steg 2. 35 cykler

Steg 6 72 °C 1 minut

Steg 7 4 °C Stanna

PCR-produkterna kan köras direkt i en gel eller förvaras vid 4 °C.

Agarosgell-elektrofores (3 %) (provprotokoll)

50X TAE

Tris	24,2 g
Isättika	5,71 ml
Na ₂ (EDTA)·2H ₂ O	3,72 g
Tillsätt vatten till 100 ml	

1X TAE

H ₂ O	392 ml
50X TAE	8 ml

3:1-agaros

- 3 delar NuSieve™ GTG™-agaros
- 1 del Fisher-agaros med låg elektroosmos (EEO)

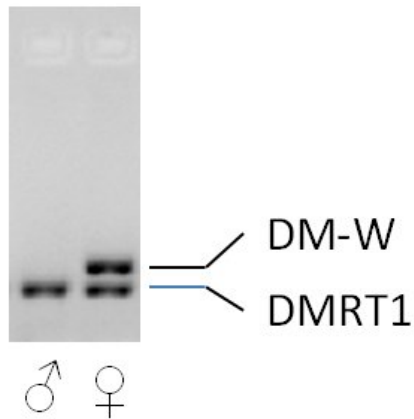
Metod

1. Bered en 3-procentig gel genom att tillsätta 1,2 g agarosmix till 43 ml 1X TAE. Roter för att lösa upp stora klumpar.
2. Kör agarosblandningen i mikrovågsugn tills den är helt upplöst (se till att den inte kokar över). Låt blandningen svalna något.
3. Tillsätt 1,0 µl etidiumbromid (10 mg/ml). Roter kolven. Observera att etidiumbromid är mutagent, så alternativa kemikalier bör i den mån det är tekniskt möjligt användas för detta steg för att minimera hälsoriskerna för personalen¹.
4. Häll gelen i en form med kam. Låt svalna helt.
5. Tillsätt gel till apparaten. Täck gelen med 1X TAE.
6. Tillsätt 1 µl med 6x laddningsfärg till varje PCR-produkt på 10 µl.
7. Pipettera proverna i brunnarna.
8. Kör med konstant spänning, 160 volt, under ~20 minuter.

¹ I enlighet med artikel 4.1 i Europaparlamentets och rådets direktiv 2004/37/EG av den 29 april 2004 om skydd för arbetstagare mot risker vid exponering för carcinogener eller mutagena ämnen i arbetet (sjätte särdirektivet enligt artikel 16.1 i rådets direktiv 89/391/EEG) (EUT L 158, 30.4.2004, s. 50).

En bild på agarosgel som uppvisar bandmönstren för hane och hona visas i **figur 1**.

Figur 1: Bild på agarosgel som uppvisar bandmönstret för en hane (♂) (ett enda band vid ~203 bp: DMRT1) och för en hona (♀) (två band vid ~259 bp: DM-W och 203 bp: DMRT1).



LITTERATUR

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T och 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.

Tillägg 6

MÄTNING AV VITELLOGENIN

Vitellogenin (VTG) mäts med hjälp av en metod för enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) som ursprungligen utvecklades för mätning av VTG hos knölskallelöja (Parks m.fl., 1999). För närvarande finns det inga kommersiellt tillgängliga antikroppar för *Xenopus laevis*. Med tanke på all den information som finns om detta protein och tillgången till kostnadseffektiva kommersiella tjänster för produktion av antikroppar, är det dock rimligt att tro att laboratorier enkelt kan utveckla en ELISA för att utföra denna mätning (Olmstead m.fl., 2009). Olmstead m.fl. (2009) ger även en beskrivning av testet modifierat för mätning av VTG hos *Xenopus tropicalis*, enligt nedan. För metoden används en antikropp som har tagits fram avseende VTG hos *Xenopus tropicalis*, men det är känt att den även fungerar för VTG hos *Xenopus laevis*. Det bör noteras att icke-kompetitiva ELISA-metoder också kan användas och att dessa kan ha lägre detektionsgränser än den metod som beskrivs nedan.

Utrustning och reagenser

- Föradsorberat serum för primär antikropp (Ab)

Blanda 1 del anti-*Xenopus tropicalis* VTG-serum för primär antikropp med 2 delar plasma från kontrollhane och lämna i rumstemperatur under ~75 minuter, lägg sedan blandningen på is under 30 minuter, centrifugera vid > 20 000 g under 1 timme vid 4 °C, avlägsna supernatanten, dela upp i alikvoter och förvara vid -20 °C

- Sekundär antikropp

Get-anti-kanin-IgG-HRP-konjugat (till exempel Bio-Rad 172-1019)

- VTG-standard

Renad *Xenopus laevis*-VTG i koncentrationen 3,3 mg/ml

- TMB (3,3',5,5'-tetrametylbenzidin) (till exempel KPL 50-76-00 eller Sigma T0440)
- Normalt getserum (NGS)(till exempel Chemicon® S26, 100 ml)
- EIA-mikrotiterplattor av polystyren med 96 brunnar (till exempel ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)
- Hybridiseringsugn som håller 37 °C (eller en luftinkubator som snabbt hittar rätt temperatur) för plattor, vattenbad för rör
- Annan normalt förekommande laboratorieutrustning och andra normalt förekommande kemikalier och material

Beredning

Coating-buffert (50 mM karbonatbuffert, pH 9,6):

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

10X PBS (0,1 M fosfat, 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
Vatten	810 ml

Tvättbuffert (PBST):

10X PBS	100 ml
Vatten	900 ml

Justera pH-värdet till 7,3 med 1 M HCl och tillsätt sedan 0,5 ml Tween-20

Testbuffert:

Normalt getserum (NGS)	3,75 ml
Tvättbuffert	146,25 ml

Provtagning

Blod samlas in med ett hepariniserat mikrohematokritrör och läggs på is. Efter tre minuters centrifugering repas röret, varefter det bryts upp och plasman hälls över i mikrocentrifugrör på 0,6 ml som innehåller 0,13 enheter frystorkad aprotinin. (Dessa rör förbereds i förväg genom att lämplig mängd aprotinin tillsätts, fryses och frystorkas i en vakuumcentrifug [speed-vac] inställd på låg temperatur tills ämnet är torrt.) Förvara plasman vid –80 °C tills det är dags för analys.

Förfarande för en platta

Bestrykning ("coating") av plattan

Blanda 20 µl renad VTG med 22 ml karbonatbuffert (slutlig koncentration på 3 µg/ml). Tillsätt 200 µl till varje brunn i en 96-hålsplatta. Täck plattan med självhäftande tätningsfilm och låt den inkubera vid 37 °C under två timmar (eller vid 4 °C över natten).

Blockering av plattan

Blockeringslösning bereds genom att 2 ml normalt getserum (NGS) tillsätts till 38 ml karbonatbuffert. Avlägsna coating-lösningen och skaka torrt. Tillsätt 350 µl blockeringslösning i varje brunn. Täck med självhäftande tätningsfilm och låt plattan inkubera vid 37 °C under två timmar (eller vid 4 °C över natten).

Beredning av standardlösningar

Blanda 5,8 µl renad VTG-standard med 1,5 ml testbuffert i ett engångsprovör av borsilikatglas på 12 × 75 mm. Detta ger en koncentration på 12 760 ng/ml. Gör därefter en serieutspädning genom att tillsätta 750 µl av den tidigare lösningen till 750 µl testbuffert, för att få slutliga koncentrationer på 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100, och 50 ng/ml.

Beredning av prov

Starta med en lösning av plasma i testbuffert på 1:300 (kombinera exempelvis 1 µl plasma med 299 µl testbuffert) eller 1:30. Om en större mängd VTG förväntas kan ytterligare eller mer omfattande utspädningar behövas. Försök hålla B/B₀ inom standardlösningarnas intervall. För prover utan märkbara VTG-nivåer, till exempel från hanar och honor i kontrollgruppen (som alla är omogna), ska lösningen på 1:30 användas. Prover som späds ut mindre än så kan uppvisa oönskade matriseffekter.

Därtill rekommenderas det att man använder ett prov för positiv kontroll på varje platta. Detta prov hämtas från en plasmasamling som innehåller höga inducerade VTG-nivåer. Samlingen späds inledningsvis i NGS, delas upp i aliquoter och förvaras vid -80 °C. För varje platta tinas en aliquot som späds ytterligare i testbuffert och hanteras på samma sätt som ett vanligt prov i testet.

Inkubering med primär antikropp

Den primära antikroppen bereds genom att föradsorberat serum för den primära antikroppen späds i testbuffert i förhållandet 1:2 000 (till exempel 8 µl i 16 ml testbuffert). Kombinera 300 µl lösning av den primära antikroppen med 300 µl av provet/standardlösningen i ett glasrör. B₀-röret bereds på ett liknande sätt med 300 µl testbuffert och 300 µl antikropp. Dessutom ska ett NSB-rör beredas med enbart 600 µl testbuffert, det vill säga utan antikropp. Täck rören med Parafilm och rotera dem försiktigt för att blanda om. Låt inkubera i vattenbad vid 37 °C under en timme.

Tvätt av plattan

Precis innan inkuberingen av den primära antikroppen är klar ska plattan tvättas. Detta görs genom att innehållet skakas ut och plattan bankas torr på absorberande papper. Fyll därefter brunnarna med 350 µl tvättlösning, töm ut lösningen och banka plattan torr. En multipipett med repetitionsfunktion eller en platt-tvätt kan komma väl till pass i detta sammanhang.

Tvättsteget upprepas två gånger till, så att det sammanlagt blir tre tvättar.

Fyllande av plattan

När plattan har tvättats ska rören tas ut ur vattenbadet och roteras försiktigt. Tillsätt 200 µl från varje rör med provlösning, standardlösning, B₀ och NSB till dubbla brunnar i plattan. Täck plattan med självhäftande tätningsfilm och låt den inkubera under en timme vid 37 °C.

Inkubering med sekundär antikropp

När inkuberingen i föregående steg är klar ska plattan tvättas tre gånger igen, på samma sätt som ovan. Den utspädda sekundära antikroppen bereds genom att 2,5 µl av den sekundära antikroppen blandas med 50 ml testbuffert. Tillsätt 200 µl utspädd sekundär buffertlösning till varje brunn, täta på samma sätt som ovan och inkubera under en timme vid 37 °C.

Tillsättning av substrat

När inkuberingen med den sekundära antikroppen är klar ska plattan tvättas tre gånger på samma sätt som beskrivs ovan. Tillsätt sedan 100 µl TMB-substrat i varje brunn. Låt reaktionen fortgå under 10 minuter, helst på en plats utan starkt ljus. Stoppa reaktionen genom att tillsätta 100 µl 1 M fosforsyra. Detta ändrar färgen från blå till intensivt gul. Mät absorbansen vid 450 nm med en plattläsare.

Beräkning av B/B₀

Subtrahera det genomsnittliga NSB-värdet från alla mätresultat. B/B₀ för varje prov och standardlösning beräknas genom att absorptionsvärdet (B) divideras med den genomsnittliga absorptionen för B₀-provet.

Erhållande av standardkurva och fastställande av okända mängder

Ta fram en standardkurva med hjälp av någon programvara för framtagning av grafer (till exempel Slidewrite™ eller Sigma Plot®) som extrapolerar kvantiteten från provets B/B₀-värde utifrån B/B₀-värdena för standardlösningar. Normalt plottas mängden på en logaritmisk skala och kurvan får en sigmoidform (S-form). Det kan dock hända att den ser linjär ut vid användning av ett smalt intervall av standardlösningar. Korrigera provmängderna utifrån utspädningsfaktorn och redovisa som mg VTG/ml plasma.

Fastställande av lägsta detektionsgränser (MDL – Minimum Detection Limits)

Ofta, i synnerhet för normala hanar, är det inte helt klart hur resultat från låga värden ska redovisas. I dessa fall bör 95-procentiga konfidensgränser användas för att fastställa om värdet ska redovisas som noll eller som något annat tal. Om provresultatet ligger inom konfidensintervallet för nollstandarden (B₀) ska resultatet redovisas som noll. Den lägsta detektionsnivån blir den lägsta standard som konsekvent avviker från nollstandarden, det vill säga de båda konfidensintervallen överlappar inte varandra. För alla provresultat som ligger inom konfidensgränsen för den lägsta detektionsnivån, eller högre, redovisas det

beräknade värdet. Om ett prov hamnar mellan intervallen för nollstandarden och den lägsta detektionsnivån ska hälften av den lägsta detektionsnivån redovisas som värde för detta prov.

LITTERATUR

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

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

Tillägg 7

STATISTISK ANALYS

LAGDA-testet genererar tre typer av data som kan analyseras statistiskt: 1) kvantitativa kontinuerliga data, 2) tid-till-händelse-data avseende utvecklingstakt (tid till NF-stadium 62) och 3) ordinaldata i form av allvarlighetsgrader eller utvecklingsstadier från histopatologiska bedömningar. Det rekommenderade beslutsträdet för statistisk analys för LAGDA-testet visas i figur 1. Nedan anges även vissa förklarande kommentarer som kan behövas för utförandet av den statistiska analysen av mätningarna från LAGDA-testet. Vid användning av beslutsträdet för analysen ska resultat från mätningarna av dödlighet, tillväxt (vikt och längd) och leversomatiskt index (LSI) analyseras enligt grenen ”Övriga endpoints”.

Kontinuerliga data

Data för kontinuerliga endpoints bör först kontrolleras med avseende på monotonicitet genom rangordningsomvandling av data, tillämpning av en variansanalysmodell och jämförelse av linjära och kvadratiske kontraster. Om data är monotona bör ett step-down-trendtest av typen Jonckheere-Terpstra utföras på replikatens medianvärden varpå inga efterföljande analyser ska utföras. Ett alternativ för data som är normalfördelade med homogena varianser är step-down-testet av Williams-typ. Om data är icke-monotona (kvadratisk kontrast är signifikant och linjär är inte signifikant), bör de analyseras med användning av en variansanalysmodell med blandade effekter. Data bör därefter bedömas med avseende på normalitet (helst med användning av Shapiro-Wilk-testet eller Anderson-Darling-testet) och varianshomogenitet (helst med användning av Levenes test). Båda testerna utförs på residualerna från variansanalysmodellen med blandade effekter. Expertbedömning kan användas i stället för dessa formella tester avseende normalitet och varianshomogenitet, men de formella testerna är att föredra. Om data är normalfördelade med homogen varians är förutsättningarna för en variansanalys med blandade effekter uppfyllda och en signifikant behandlingseffekt fastställs genom Dunnetts test. När icke-normalitet eller variansheterogenitet upptäcks uppfylls inte förutsättningarna för Dunnetts test och en normaliserande och variansstabiliserande omvandling ska eftersökas. Om ingen sådan omvandling går att hitta fastställs en signifikant behandlingseffekt med Dunns test. När så är möjligt ska ett ensidigt test utföras i stället för ett tvåsidigt test, men det krävs expertbedömning för att avgöra vad som är lämpligt för en viss endpoint.

Dödlighet

Data gällande dödlighet ska analyseras för en tidsperiod som omfattar hela testet och ska uttryckas som andelen som dog i ett visst akvarium. Grodyngel som inte slutför metamorfosen inom den angivna tidsramen, grodyngel som ingår i kohorten för delprovtagning på yngel, juvenila grodor som gallras bort och alla djur som eventuellt dör till följd av fel från testutövarens sida, ska behandlas som censurerade data och inte inkluderas i nämnaren vid procentberäkningen. Innan någon statistisk analys genomförs ska

dödlighetsförhållandena genomgå en arcussinus-kvadratrots transformation. Ett alternativ är att använda step-down-testet av Cochran-Armitage-typ, eventuellt med en Rao-Scott-justering vid överdispersion.

Vikt och längd (tillväxtdata)

Hanar och honor är inte sexuellt dimorfa under metamorfosen, så tillväxtdata från delprovtagningen på yngel ska analyseras oberoende av kön. Tillväxtdata för juvenila grodor bör dock analyseras separat utifrån genetiskt kön. En log-transformation kan behövas för dessa endpoints eftersom logaritmisk normalitet inte är ovanligt för storleksdata.

Leversomatiskt index (LSI)

Levervikter ska normaliseras som en proportion av hela kroppsvikten (det vill säga LSI) och analyseras separat utifrån genetiskt kön.

Tid till NF-stadium 62

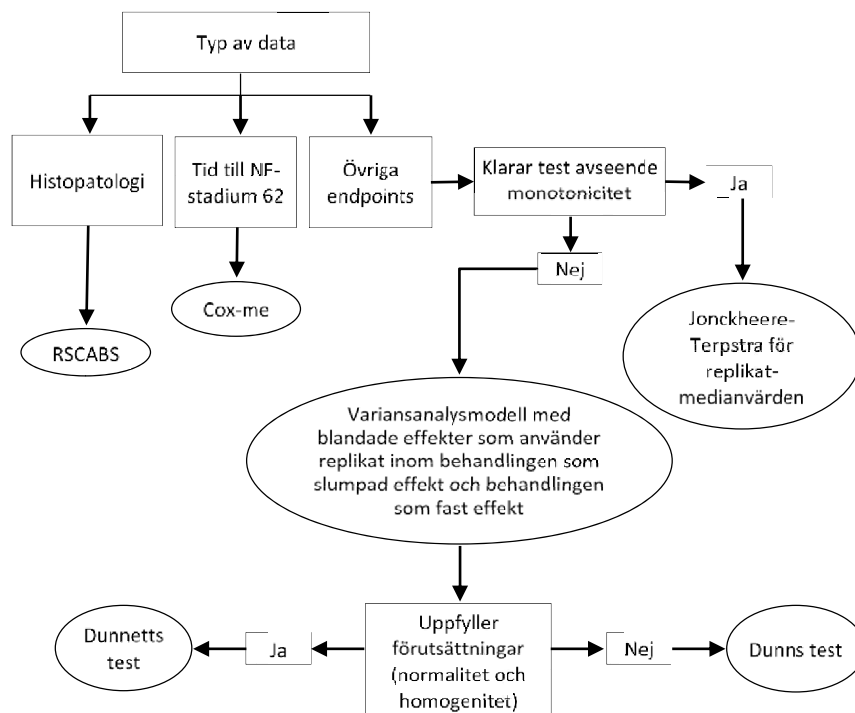
Data gällande tiden till metamorfos ska behandlas som tid-till-händelse-data, med eventuella dödsfall eller individer som inte uppnår NF-stadium 62 inom 70 dygn behandlade som höger-censurerade data (det vill säga det verkliga värdet är högre än 70 dygn, men studien avslutas efter 70 dygn innan djuren har uppnått NF-stadium 62). Mediantiden till slutförandet av metamorfosen, det vill säga NF-stadium 62, för kontrollgrupperna med spädvatten ska användas för att fastställa testets slutdatum. Mediantiden till slutförandet av metamorfosen kan fastställas genom Kaplan-Meier-skattningar ("product-limit"). Denna endpoint bör analyseras med användning av en proportionell riskmodell av Cox-typ med blandade effekter som tar hänsyn till studiens replikatstruktur.

Histopatologiska data (allvarlighetsgrader och utvecklingsstadier)

Testets histopatologiska data rapporteras i form av allvarlighetsgrader eller utvecklingsstadier. Ett test vid namn RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) använder ett step-down-trendtest av Cochran-Armitage-typ med Rao-Scott-justering för varje allvarlighetsnivå inom en histopatologisk respons (Green m.fl., 2014). Rao-Scott-justeringen inkluderar testutformningen med replikatkärl i testet. Metoden "by Slices" inkluderar den biologiska förväntan att effekternas allvarlighetsgrad tenderar att öka med ökande doser eller koncentrationer, samtidigt som de enskilda allvarlighetsgraderna bibehålls och graden av allvar hos eventuella funna effekter visas. RSCABS-metoden fastställer inte bara vilka behandlingar som statistiskt skiljer sig från kontrollgrupperna (det vill säga har en allvarligare patologi än kontrollgrupperna), utan fastställer även vid vilken allvarlighetsgrad skillnaden inträffar, vilket ger en välbehövlig kontext för analysen. Om utvecklingsstadiet för gonader och äggledare eller sädesledare ska fastställas, bör en ytterligare databearbetning utföras eftersom en förutsättning för RSCABS-metoden är att effektens allvarlighetsgrad ökar med dosen. Den observerade effekten skulle kunna vara en fördröjning eller ett påskyndande av utvecklingen. Av den anledningen bör data gällande utvecklingsstadier analyseras såsom de redovisas för att ett påskyndande av utvecklingen

ska kunna detekteras, varefter de inverteras manuellt inför en andra analys för att en fördröjning av utvecklingen ska kunna detekteras.

Figur 1: Beslutsträd för statistisk analys för LAGDA-testets data



LITTERATUR

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

Tillägg 8

ATT TÄNKA PÅ FÖR ATT KUNNA FÖLJA OCH MINIMERA FÖREKOMSTEN AV SKOLIOS

Idiopatisk skolios, som vanligtvis visar sig som en ”böjd svans” hos *Xenopus laevis*-grodyngel, kan komplicera de morfologiska och beteendemässiga observationerna gällande testpopulationer. Ansträngningar bör göras för att minimera eller eliminera förekomsten av skolios, både i stammen och under testbetingelserna. I det slutliga testet rekommenderas det att prevalensen av måttlig och svår skolios ska vara lägre än 10 %, för att öka konfidensen för att testet kan detektera behandlingsrelaterade utvecklingseffekter hos i övrigt friska grodyngel.

Vid dagliga observationer under det slutliga testet bör såväl förekomsten av skolios (räkning av antalet individer) som hur allvarlig denna skolios är registreras, i de fall då skolios förekommer. Missbildningarnas karaktär bör beskrivas med avseende på plats på kroppen (till exempel framför eller bakom anus/genitalöppningen) och krökningens riktning (till exempel åt sidan eller från rygg till buk). Hur allvarlig skoliosen är kan graderas på följande sätt:

(NR) Ej påfallande (Not Remarkable): ingen krökning.

(1) Minimal: lätt krökning åt sidan bakom anus/genitalöppningen, märks endast vid vila.

(2) Måttlig: krökning åt sidan bakom anus/genitalöppningen, syns hela tiden med hämmar inte rörelsen.

(3) Allvarlig: krökning åt sidan framför anus/genitalöppningen, ELLER någon typ av krökning som hämmar rörelsen, ELLER någon typ av krökning från rygg till buk.

En vetenskaplig rådgivande panel upprättad av Förenta staternas miljöförvaltningsmyndighet EPA (FIFRA SAP 2013) har gått igenom sammanställda data rörande skolios i femton tester avseende groddjursmetamorfos med *Xenopus laevis* (NF-stadium 51 till 60+) och lämnat allmänna rekommendationer för hur man kan minska prevalensen av denna missbildning i testpopulationer. Dessa rekommendationer är relevanta för LAGDA-testet, även om detta test omfattar en längre utvecklingsmässig tidslinje.

Historiska lekresultat

Generellt sett ska friska, vuxna grodor av god kvalitet användas som avelspar; genom att eliminera avelspar som ger upphov till avkomma med skolios kan man minimera förekomsten av skolios över tid. I synnerhet kan en minimerad användning av vildfångat avelsbestånd vara gynnsamt. LAGDA-testets exponeringsperiod börjar med embryon i NF-stadium 8–10 och det går inte att fastställa vid testets start huruvida enskilda individer

kommer att utveckla skolios. Därför bör man, förutom att följa prevalensen av skolios hos de djur som används i testet, dokumentera de historiska kullresultaten (inklusive prevalensen av skolios hos eventuella yngel som har fått utvecklas). Det kan vara värdefullt att fortsätta följa den del av varje kull som inte används i en viss studie och att redovisa dessa observationer (FIFRA SAP 2013).

Vattenkvalitet

Det är viktigt att säkerställa en fullgod vattenkvalitet, såväl för laboratoriestammen som under testet. Förutom de kriterier avseende vattenkvalitet som rutinmässigt bedöms i samband med tester av akvatisk toxicitet, kan det vara värdefullt att kontrollera och korrigera eventuella näringsbrister (till exempel brist på vitamin C, kalcium eller fosfor) eller alltför höga nivåer av selen och koppar, vilka rapporteras orsaka skolios i varierande grad hos laboratorieuppfödda *Rana* sp. och *Xenopus* sp. (Marshall m.fl., 1980, Leibovitz m.fl., 1992, Martinez m.fl., 1992, enligt rapport från FIFRA SAP 2013). Användning av ett lämpligt utfodringsprogram (se tillägg 4) och regelbunden rengöring av akvarierna förbättrar generellt vattenkvaliteten och försöksdjurens hälsa.

Foder

Specifika rekommendationer för ett utfodringsprogram som har visat sig fungera väl för LAGDA-testet anges i detalj i tillägg 4. Det rekommenderas att foderkällorna kontrolleras med avseende på biologiska gifter, herbicider och andra bekämpningsmedel som man vet kan orsaka skolios hos *Xenopus laevis* eller andra vattenlevande djur (Schlenk och Jenkins, 2013). Till exempel har exponering för vissa kolinesterashämmare kopplats till skolios hos fiskar (Schultz m.fl., 1985) och grodor (Bacchetta m.fl., 2008).

LITTERATUR

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

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

Marshall, G.A., R.L. Amborski och 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 och P. Herraiez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. *Anatomical Records* 233(2): 314–320.

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