II

(Icke-lagstiftningsakter)

FÖRORDNINGAR

KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EU) 2019/1390

av den 31 juli 2019

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)

(Text av betydelse för EES)

EUROPEISKA KOMMISSIONEN HAR ANTAGIT DENNA FÖRORDNING

med beaktande av fördraget om Europeiska unionens funktionssätt,

med beaktande av Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 av den 18 december 2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach), inrättande av en europeisk kemikaliemyndighet, ändring av direktiv 1999/45/EG och upphävande av rådets förordning (EEG) nr 793/93 och kommissionens förordning (EG) nr 1488/94 samt rådets direktiv 76/769/EEG och kommissionens direktiv 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG och 2000/21/EG [1], särskilt artikel 13.2, och

av följande skäl:

(1) I kommissionens förordning (EG) nr 440/2008 [2] fastställs testmetoder som ska användas för tillämpning av förordning (EG) nr 1907/2006 när det gäller bestämning av kemikaliers fysikalisk-kemiska egenskaper, toxicitet och ekotoxicitet.

(2) Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD) utvecklar harmoniserade och internationellt överenskomna testriktlinjer för testning av kemikalier för tillsynsändamål. OECD utfärdar regelbundet nya och reviderade testriktlinjer som tar hänsyn till den vetenskapliga utvecklingen inom området.

(3) För att ta hänsyn till den tekniska utvecklingen och, när så är möjligt, minska antalet djur som används för djurförsök i enlighet med artikel 13.2 i förordning (EG) nr 1907/2006 bör, efter det att relevanta testriktlinjer från OECD har antagits, två nya testmetoder för bedömning av ekotoxicitet och nio nya testmetoder för bestämning av toxicitet för människors hälsa fastställas och sju testmetoder uppdateras. Elva av dessa testmetoder gäller in vitro-tester avseende irritation/korrosion av hud och ögon, hudsensibilisering, genotoxicitet och endokrina verkningar. Berörda parter har rådfrågats angående den föreslagna ändringen.

[1] EUT L 396, 30.12.2006, s. 1.

[2] Kommissionens förordning (EG) nr 440/2008 av den 30 maj 2008 om testmetoder enligt Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach) (EUT L 142, 31.5.2008, s. 1).

(4) Förordning (EG) nr 440/2008 bör därför ändras i enlighet med detta.

(5) De åtgärder som föreskrivs i denna förordning är förenliga med yttrandet från den kommitté som inrättats enligt artikel 133 i förordning (EG) nr 1907/2006.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

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

Artikel 2

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

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

Utfärdad i Bryssel den 31 juli 2019.

På kommissionens vägnar
Jean-Claude JUNCKER
Ordförande

BILAGA

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

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

"B.4 **AKUT HUDIRRITATION/HUDKORROSION**

INLEDNING

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

2. Definitioner av hudirritation och hudkorrosion finns i tillägget till den här testmetoden.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

3. För en sund vetenskap och för djurs välbefinnande bör in vivo-testning inte utföras förrän alla relevanta data för den potentiella hudkorrosionen/hudirritationen orsakad av testkemikalien har utvärderats i en sammanvägd bedömning (weight of evidence) i enlighet med vägledningsdokumentet om ett integrerat synsätt på testning och bedömning (IATA) av hudkorrosion och hudirritation, dvs. i enlighet med dokumentets tre delar och deras respektive moduler (1). I del 1 ges en presentation av tillgängliga data i sju moduler som omfattar humandata, in vivo-data, in vitro-data, data om fysikalisk-kemiska egenskaper (t.ex. pH, särskilt starkt surt eller alkaliskt) samt metoder som inte innebär testning. I del 2 utförs en WoE-analys. Om WoE-analysen inte ger något entydigt resultat ska del 3 genomföras med kompletterande testning, först med in vitro-metoder och sedan med in vivo-testning som en sista utväg. Genom analysen bör man kunna minska behovet av in vivo-testning med avseende på hudkorrosion/hudirritation av sådana testkemikalier för vilka det redan finns tillräckliga belägg från andra undersökningar för dessa två endpoints.

PRINCIP FÖR IN VIVO-TESTET

4. Testkemikalien appliceras som en engångsdos på försöksdjurets hud. Djurets obehandlade hudområden används som kontroll. Graden av irritation/korrosion granskas och poängsätts med specificerade intervall, och beskrivs närmare så att en fullständig utvärdering av effekterna erhålls. Testet bör pågå tillräckligt länge för att ge möjlighet att utvärdera om de observerade verkningarna är reversibla eller irreversibla.

5. Djur som uppvisar ihållande tecken på allvarligt lidande och/eller smärta i något skede av testet bör avlivas på ett skonsamt sätt, och detta bör beaktas vid utvärderingen av testkemikalien. Kriterier för att fatta beslut om skonsam avlivning av döende eller allvarligt lidande djur finns i ett separat vägledningsdokument (2).

FÖRBEREDELSER FÖR IN VIVO-TESTET

Val av djurart

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

Förberedelse av djuren

7. Cirka 24 timmar före testet bör djurens päls avlägsnas genom kortklippning av flankens ryggsida. Varsamhet bör iakttas för att inte repa huden, och endast djur med frisk och intakt hud bör användas.

8. Kaniner av vissa stammar har områden med särskilt tät päls som är mer framträdande under vissa tider på året. Sådana områden bör inte användas för testning.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

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

TESTNINGSFÖRFARANDE

Applicering av testkemikalien

10. Testkemikalien appliceras på en liten yta (cirka 6 cm^2) av huden och täcks med en kompress som hålls på plats med ett icke-irriterande häftförband. Om det inte är möjligt att applicera testkemikalien direkt (exempelvis vätskor eller vissa pastor) bör den först appliceras på kompressen, som därefter placeras på huden. Kompressen ska under exponeringsperioden hållas i lös kontakt med huden med hjälp av ett lämpligt halvocklusivt förband. Om testkemikalien appliceras på kompressen bör denna fästas på huden på ett sätt som säkerställer god kontakt och en jämn fördelning av kemikalien på huden. Man bör se till att djuret inte når kompressen eller kan äta eller andas in testkemikalien.

11. Flytande testkemikalier används vanligen outspädda. Vid testning av fasta ämnen (som vid behov kan pulveriseras) ska testkemikalien vätas med minsta möjliga mängd vatten (eller vid behov någon annan lämplig vehikel) som behövs för att säkerställa god hudkontakt. Om annan vehikel än vatten används bör vehikelns potentiella inverkan på den hudirritation som testkemikalien framkallar vara minimal eller noll.

12. I slutet av exponeringsperioden (som i regel varar fyra timmar) ska rester av testkemikalien om möjligt avlägsnas med vatten eller ett lämpligt lösningsmedel, utan att störa befintlig respons eller skada huden.

Doseringsnivå

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

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

14. Om en testkemikalie bedömts vara frätande eller irriterande eller inte går att klassificera efter en sammanvägd bedömning eller en tidigare in vitro-testning är ytterligare in vivo-testning i regel inte nödvändig. I fall där man bedömer att det krävs ytterligare data ska in vivo-testet utföras först, med användning av ett djur och i enlighet med följande förfarande. Upp till tre testkompresser appliceras sekventiellt på djuret. Den första kompressen tas bort efter tre minuter. Om ingen allvarlig hudreaktion kan observeras appliceras en andra kompress, som i sin tur tas bort efter en timme. Om observationerna i detta skede tyder på att exponeringen kan förlängas till fyra timmar utan lidande för testdjuret, appliceras en tredje kompress, som tas bort efter fyra timmar. Därefter kan responsen graderas.

15. Om korrosion kan observeras efter någon av de tre sekventiella exponeringarna avslutas testet omedelbart. Om ingen korrosion observeras efter att den sista kompressen har tagits bort, hålls djuret under observation i 14 dagar, utom om korrosion framkallas tidigare.

16. I fall där testkemikalien inte förväntas framkalla korrosion men där den kan vara irriterande, appliceras en enstaka kompress på ett djur i fyra timmar.

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

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

Observationsperiod

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

Kliniska observationer och gradering av hudreaktionerna

19. Alla djur bör undersökas för tecken på hudrodnad och ödem, och den respons som erhållits vid 60 minuter och därefter vid 24, 48 och 72 timmar efter borttagning av kompresserna registreras. Vid inledande test på ett enskilt djur undersöks applikationsstället omedelbart efter att kompressen har tagits bort. Hudreaktionerna graderas och registreras enligt klassificeringsskalan i tabellen nedan. Om det uppkommit en hudskada som efter 72 timmar inte kan identifieras som irritation eller korrosion kan det krävas observationer fram till dag 14 för att avgöra om effekerna är reversibla. Utöver observationerna av irritation bör alla lokala toxiska effekter, t.ex. avfettning av huden, och alla skadliga systemiska effekter (t.ex. kliniska tecken på toxicitet eller effekter på kroppsvikten) till fullo beskrivas och registreras. I fall av tvetydig respons bör en histopatologisk undersökning övervägas i klargörande syfte.

20. Graderingen av hudresponser är alltid subjektiv. För att underlätta harmonisering i fråga om graderingen av hudresponser och som stöd för testningslaboratorier och för de personer som utför och tolkar observationer, måste den personal som utför observationerna få adekvat utbildning i det poängsättningssystem som används (se tabellen nedan). En illustrerad vägledning för gradering av hudirritation och andra skador kan vara till hjälp (3).

DATA OCH RAPPORTERING

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

Utvärdering av resultaten

22. Graderna av hudirritation bör bedömas med hänsyn till skadornas natur och allvarlighetsgrad samt till om skadorna är reversibla eller irreversibla. Individuella klassificeringsresultat utgör ingen absolut standard för ett materials förmåga att framkalla irritation, eftersom även andra effekter av testmaterialet utvärderas. De enskilda bedömningarna bör däremot ses som referensvärden, som bör utvärderas i kombination med alla andra observationer från undersökningen.

23. Reversibiliteten hos hudskador bör beaktas när man utvärderar respons med avseende på irriterande egenskaper. Om verkningar av typen alopeci (begränsat område), hyperkeratos, hyperplasi och flagning håller i sig i slutet av den 14 dagar långa observationsperioden, bör testkemikalien betraktas som irriterande.

Testrapport

24. Testrapporten ska innehålla följande uppgifter:

Motivering för in vivo-testning:

— Sammanvägd bedömning av redan tillgängliga testdata, inbegripet resultat från strategin med stegvis testning.

— Beskrivning av relevanta data som erhållits före testningen.

— Data som erhållits från de enskilda stegen i teststrategin.

— Beskrivning av utförda in vitro-tester, inklusive uppgifter om förfaranden samt resultat som erhållits med test- och referensämnen.

— Sammanvägd bedömning för utförande av in vivo-försök.

Testkemikalie:

— Monokomponentämne: kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.

— Multikomponentämnen, ämnen och blandningar med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter och biologiskt material (UVCB): karakteriseras så långt som möjligt genom beståndsdelarnas kemiska identitet (se ovan), kvantitativa förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Fysikaliskt tillstånd, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Ursprung, satsnummer om sådant finns.

— Eventuell behandling av testkemikalien/kontrollämnet före testning (t.ex. uppvärmning, malning).

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

— Lagringsförhållanden.

Vehikel:

— Identifieringsdata, koncentration (om tillämpligt), volym som har använts.

— Motivering för val av vehikel.

Försöksdjur:

— Art och stam som har använts, motivering om albinokanin inte har använts.

— Antalet djur per kön.

— De enskilda djurens vikt vid testets start och slut.

— Djurens ålder vid testets start.

— Ursprung, förvaringsförhållanden, foder och dylikt.

Testbetingelser:

— Metod för förberedelse av kompressområde.

— Uppgifter om använt kompressmaterial och kompressmetod.

— Uppgifter om testkemikaliens beredning, applicering och borttagning.

Resultat:

— En tabell med graderad irritations-/korrosionsrespons för varje djur vid samtliga observationspunkter.

— Beskrivningar av alla observerade skador.

— Beskrivande redogörelse av typen och graden av den irritation eller korrosion som observerats samt eventuella histopatologiska fynd.

— Beskrivning av andra skadliga lokala (till exempel avfettning av huden) och systemiska verkningar utöver hudirritation eller hudkorrosion.

Diskussion av resultaten

Slutsatser

LITTERATUR

(1) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 203, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, undertecknat vid det 28:e mötet mellan kemikaliekommittén och kemikaliearbetsgruppen i november 1998.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 19, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

TABELL

GRADERING AV HUDREAKTIONER

Rodnad och sårskorpebildning

Ingen rodnad	0
Svag rodnad (knappt skönjbart)	1
Väldefinierad rodnad	2
Måttlig till svår rodnad	3
Svår rodnad (köttrodnad) till sårskorpebildning som förhindrar gradering av rodnaden	4

Högsta möjliga poäng: 4

Ödembildning

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

Högsta möjliga poäng: 4

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

Tillägg

DEFINITIONER

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

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

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

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

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

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

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 476 (2016). Testmetoder ses regelbundet över med avseende på den vetenskapliga utvecklingen, nya bestämmelser samt djurens välbefinnande. Denna nya omarbetade version av TM B.17 speglar nästan trettio års erfarenhet av detta test och är också resultatet av utvecklingen av en ny och separat metod för in vitro-tester avseende genmutation hos däggdjursceller med användning av thymidinkinasgenen. TM B.17 ingår i en serie av testmetoder för genetisk toxikologi. Ett OECD-dokument som ger kortfattad information om tester inom genetisk toxikologi och en översikt över de senaste ändringarna av dessa testriktlinjer har utarbetats (1).

2. Syftet med genmutationstestet för däggdjursceller in vitro är att upptäcka genmutationer som inducerats av kemikalier. De cellinjer som används i dessa tester mäter framåtmutationer i rapportgener, i detta fall genen för endogent hypoxantin-guanin-fosforibosyltransferas (Hprt i gnagarceller, HPRT i mänskliga celler, vilka i den här testmetoden går under den samlade benämningen Hprt-genen och HPRT-testet) samt xantin-guanin-fosforibosyltransferas-transgenen (gpt) (här kallat *XPRT-testet*). Mutationstesterna HPRT och XPRT används för att påvisa olika spektra av genetiska händelser. Utöver de mutationshändelser som påvisas genom HPRT-testet (t.ex. punktmutationer, läsramsmutationer, små deletioner och insertioner) kan gpt-transgenens autosomala läge göra det möjligt att påvisa mutationer som uppstår på grund av stora deletioner och möjligen mitotisk rekombination som inte påvisas genom HPRT-testet eftersom Hprt-genen är belägen på X-kromosomen (2) (3) (4) (5) (6) (7). XPRT-testet används för närvarande i mindre omfattning än HPRT-testet för lagstadgade ändamål.

3. Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

4. Tester som utförs in vitro kräver i allmänhet att en exogen källa för metabolisk aktivering används. Det exogena metaboliska aktiveringssystemet efterliknar inte helt förhållandena in vivo.

5. Åtgärder bör vidtas för att undvika förhållanden som leder till artefaktiska positiva resultat (dvs. möjlig interaktion med testsystemet) som inte orsakas av direkt interaktion mellan testkemikalierna och cellens genetiska material. Sådana förhållanden kan vara ändringar av pH eller osmolalitet (8) (9) (10), interaktion med mediets komponenter (11) (12) eller alltför hög cytotoxicitet (13). En cytotoxicitet som överskrider de rekommenderade maxnivåerna för cytotoxicitet enligt definitionen i avsnitt 19 anses vara för hög för HPRT-test.

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

TESTPRINCIP

7. Muterade celler som saknar Hprt-enzymaktivitet i HPRT-testet eller xprt-enzymaktivitet i XPRT-testet är resistenta mot de cytostatiska effekterna av purinanalogen 6-tioguanin (TG). Celler som klarar av Hprt (i HPRT-testet) eller gpt (i XPRT-testet) är känsliga för TG eftersom TG ger upphov till inhibering av cellmetabolismen och stoppar fortsatt celldelning. Muterade celler kan därför proliferera i närvaro av TG, till skillnad från normala celler som innehåller Hprt-enzym (i HPRT-testet) eller gpt-enzym (i XPRT-testet).

8. Celler i odlingar i form av suspensioner eller monolager exponeras för testkemikalien, både med och utan en exogen källa för metabolisk aktivering (se punkt 14), under en lämplig tidsperiod (3–6 timmar) och subkultiveras sedan för att bestämma cytotoxiciteten och möjliggöra fenotypisk expression innan mutanturvalet sker (14) (15) (16) (17). Cytotoxiciteten bestäms utifrån överlevandekvoten (RS), dvs. kloningseffektiviteten som mäts omedelbart efter behandling och anpassas efter eventuell cellförlust under behandlingen till skillnad från vid en negativ kontroll (punkt 18 och tillägg 2). De behandlade odlingarna bibehålls i ett tillväxtmedium under en tillräckligt lång tid, karakteristisk för varje celltyp, för att tillåta i det närmaste optimal fenotypisk expression av inducerade mutationer (i regel under minst 7–9 dagar). Efter fenotypisk expression bestäms mutantfrekvensen genom inokulering av ett känt antal celler i ett medium som innehåller det selektiva ämnet för detektion av mutantkolonier, och i ett medium utan selektivt ämne för bestämning av kloningseffektiviteten (viabiliteten). Efter en lämplig inkubationstid räknas kolonierna. Mutantfrekvensen räknas fram utifrån antalet mutantkolonier korrigerat för kloningseffektiviteten vid tidpunkten för mutanturvalet.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Beredningar

Celler

9. De celltyper som används för HPRT- och XPRT-testerna bör ha påvisad känslighet för kemiska mutagener, hög kloningseffektivitet, stabil karyotyp och stabil spontan mutantfrekvens. Bland de vanligast förekommande cellerna för HPRT-test innefattas CHO-, CHL- och V79-linjerna från kinesiska hamsterceller, L5178Y lymfomceller från mus och TK6-linjerna från lymfoblastoidceller från människa (18) (19). AS52-celler som tagits från CHO-linjer och som innehåller gpt-transgenen (och vars Hprt-gen har eliminerats) används till XPRT-testet (20) (21). HPRT-testet kan inte utföras på AS52-celler eftersom hprt-genen har eliminerats. Om andra cellinjer används ska detta motiveras och godkännas.

10. Cellinjer bör rutinmässigt kontrolleras med avseende på det modala kromosomantalets stabilitet och frånvaro av mykoplasmakontamination (22) (23), och celler får inte användas om de är kontaminerade eller om det modala kromosomantalet har ändrats. Cellernas normala cellcykeltid som används i testlaboratoriet bör fastställas och bör överensstämma med kända cellegenskaper. Den spontana mutantfrekvensen i stamodlingen bör också kontrolleras, och odlingen bör inte användas om mutantfrekvensen inte är acceptabel.

11. Innan odlingarna används i detta test kan de behöva rensas på befintliga muterade celler, t.ex. genom att odlas i HAT-medium för HPRT-testet och MPA-medium för XPRT-testet (5) (24) (se tillägg 1). De rensade odlingarna kan frysas ner och sedan tinas upp och användas som arbetslösningar med celler. De nyupptinade arbetslösningarna med celler kan användas för testet efter att normal dubbleringstid har uppnåtts. Vid genomförande av ett XPRT-test med rutinodling av AS52-celler bör detta göras under förhållanden som garanterar att gpt-transgenen bevaras (20).

Medier och odlingsbetingelser

12. Lämpliga odlingsmedier och inkubationsförhållanden (odlingskärl, fuktad atmosfär med 5 % CO_2 och inkubationstemperatur på 37 °C) bör väljas för odlingarna. Celler bör alltid odlas under förhållanden som garanterar en logfastillväxt. Det är särskilt viktigt att odlingsmedier och -förhållanden väljs så att man säkrar optimal celltillväxt under expressionsperioden och optimal kloningseffektivitet för både muterade celler och icke-muterade celler.

Beredning av odlingarna

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

Metabolisk aktivering

14. Exogena metaboliserande system bör användas när cellerna inte har tillräcklig endogen metabolisk kapacitet. Det mest använda systemet, som rekommenderas som standard om inte annat kan motiveras, är en kofaktorstödd postmitokondriell fraktion (S9) som beretts av lever från gnagare (vanligen råttor) som behandlats med enzyminducerande ämnen, t.ex. aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) eller en kombination av fenobarbital och β-naftoflavon (29) (30) (31) (32). Den senare kombinationen bryter inte mot Stockholmskonventionen om långlivade organiska föroreningar (33) och har visat sig vara lika effektiv som aroclor 1254 när det gäller att inducera multifunktionsoxidaser (”mixed-function oxidases”) (29) (31). S9-fraktionen används vanligen i koncentrationer mellan 1–2 volymprocent men kan ökas till 10 volymprocent i det slutliga testmediet. Valet av typ och koncentration av använt exogent metaboliskt aktiveringssystem eller metabolisk induktion kan påverkas av den klass av ämnen som testas (34) (35) (36).

Beredning av testkemikalien

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

TESTBETINGELSER

Lösningsmedel

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

Mätning av cellproliferation och cytotoxicitet och val av exponeringskoncentrationer

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

18. Valet av koncentrationer baseras på cytotoxicitet och andra överväganden (se punkterna 20–22). Även om det kan vara användbart att utvärdera cytotoxicitet i ett inledande test för att bättre definiera de koncentrationer som ska användas i huvudförsöket är ett inledande test inte obligatoriskt. Även om en inledande cytotoxicitetsbedömning görs måste cytotoxiciteten för varje odling mätas i huvudexperimentet. Cytotoxicitet bör bedömas genom användning av RS, dvs. kloningseffektivitet (CE) hos celler som överförts till plattor omedelbart efter behandling, och justeras för eventuell cellförlust under behandlingen, utifrån en cellräkning, i förhållande till den justerade kloningseffektiviteten i negativa kontroller (där överlevandekvoten sätts till 100 %) (se tillägg 2 för formeln).

19. Minst fyra testkoncentrationer (exklusive lösningsmedel och positiva kontroller) som uppfyller acceptanskriterierna (lämplig cytotoxicitet, antal celler osv.) bör utvärderas. Även om användning av duplikat är att föredra kan både replikat och enskilt behandlade odlingar användas för varje koncentration som testas. De resultat som erhölls i de oberoende replikatodlingarna vid en given koncentration kan slås ihop för dataanalysen (17). För testkemikalier med låg eller ingen cytotoxicitet är två- till trefaldiga koncentrationsintervall vanligen lämpliga. Om testkemikalien är cytotoxisk bör de valda testkoncentrationerna täcka ett relevant intervall av cytotoxicitet och omfatta koncentrationer med måttlig, låg eller ingen cytotoxicitet. Många testkemikalier uppvisar koncentrationsreponskurvor. För att täcka in alla grader av cytotoxicitet eller undersöka dos-responsförhållandet i detalj kan det vara nödvändigt att använda mer nära varandra liggande koncentrationer och fler än fyra koncentrationer, i synnerhet i situationer där försöket måste upprepas (se punkt 43). Användning av mer än fyra koncentrationer kan vara särskilt viktigt vid användande av enstaka odlingar.

20. Om maxkoncentrationen ska baseras på cytotoxicitet bör den högsta koncentrationen ha ett RS-värde på mellan 20 och 10 %. Vid tolkning av positiva resultat som endast uppvisar ett RS-värde på 10 % eller lägre uppmanas till försiktighet (punkt 43).

21. För svårlösliga testkemikalier som inte är cytotoxiska vid koncentrationer under den lägsta olösliga koncentrationen bör den högsta analyserade koncentrationen framkalla grumlighet eller en fällning som är synlig med blotta ögat eller med hjälp av ett inverterat mikroskop vid slutet av behandlingen med testkemikalien. Även om cytotoxicitet uppträder över den lägsta olösliga koncentrationen är det lämpligt att testa endast en koncentration som orsakar grumlighet eller synlig fällning, eftersom fällningen kan ge artefaktiska effekter. När det gäller koncentrationer som ger fällningar bör man se till att fällningarna inte påverkar utförandet av testet negativt. Bestämning av löslighet i odlingsmediet före försöket kan vara användbart.

22. Om ingen fällning eller begränsande cytotoxicitet observeras ska de maximala testkoncentrationerna motsvara det lägsta av följande värden: 10 mM, 2 mg/ml eller 2 µl/ml (39) (40). Om testkemikalien inte har en definierad sammansättning, t.ex. ett ämne med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiskt material (dvs. UVCB) (41), miljöextrakt osv., kan man behöva använda en högre toppkoncentration (t.ex. 5 mg/ml) om cytotoxiciteten inte är tillräckligt hög, så att koncentrationen av varje komponent ökas. Det bör dock noteras att dessa krav kan skilja sig för humanläkemedel (42).

Kontroller

23. Parallella negativa kontroller (se punkt 16), bestående av enbart lösningsmedel i behandlingsmediet, och hanterade på samma sätt som behandlingsodlingarna, bör inkluderas för varje testbetingelse.

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

Tabell 1

Rekommenderade referensämnen för utvärdering av laboratoriets kompetens och för urval av positiva kontroller

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

FÖRFARANDE

Behandling med testkemikalien

25. Prolifererande celler behandlas med testkemikalien i såväl närvaro som frånvaro av ett system för metabolisk aktivering. Exponering bör ske under en lämplig tidsperiod (normalt är 3–6 timmar lagom).

26. Minimiantalet celler som används för varje testodling (kontrollodlingar och behandlade odlingar) i varje etapp i testet bör baseras på den spontana mutantfrekvensen. Enligt de allmänna anvisningarna ska ett tillräckligt stort antal celler behandlas och passera så att tio spontana mutanter kan bevaras i varje odling i testet (17). Den spontana mutantfrekvensen brukar ligga på mellan 5 och 20×10^{-6}. För att få fram en spontan mutantfrekvens på 5×10^{-6} och för att bevara ett tillräckligt stort antal spontana mutanter (10 eller fler) även i de odlingar som behandlats med koncentrationer som orsakar 90 % cytotoxicitet under behandlingen (10 % RS) är det nödvändigt att behandla minst 20 × 106 celler. Dessutom måste ett tillräckligt antal celler (aldrig färre än två miljoner) odlas fram under expressionsperioden och överföras till plattor för mutanturvalet (17).

Fenotypisk expressionstid och mätning av mutantfrekvens

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

Laboratoriets kompetens

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

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

Historiska kontrolldata

30. Laboratoriet bör fastställa följande:

— Historiskt positivt kontrollintervall samt fördelning.

— Historiskt negativt (obehandlad, lösningsmedel) kontrollintervall samt fördelning.

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

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

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

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

DATA OCH RAPPORTERING

Presentation av resultaten

35. Presentationen av resultaten bör omfatta all den data som behövs för att beräkna cytotoxiciteten (uttryckt som ett RS-värde). Data för både behandlade odlingar och kontrollodlingar bör inkludera antalet celler vid behandlingens slut, antalet celler som överförts till plattor direkt efter behandling samt antal kolonier (eller antal brunnar utan kolonier för mikrotitermetoden). RS-värdet för varje odling ska uttryckas som en procentandel av den parallella lösningsmedelskontrollen (se tillägg 1 för definitioner).

36. Redovisningen av resultat bör även omfatta alla data som behövs för att beräkna mutantfrekvensen. Data för både behandlade odlingar och kontrollodlingar bör omfatta: 1) antalet celler som överförts till plattor med respektive utan selektivt ämne (i samband med att cellerna överförts till plattor för mutanturvalet), och 2) antalet räknade kolonier (eller, för mikrotitermetoden, antalet brunnar utan kolonier) från plattorna med respektive utan selektivt ämne. Mutantfrekvensen beräknas utifrån antalet mutantkolonier (i plattor med selektivt ämne) korrigerat för kloningseffektiviteten (från plattorna utan selektivt ämne). Mutantfrekvensen uttrycks som antalet muterade celler per miljon viabla celler (se tillägg 1 för definitioner).

37. Data bör anges per enskild odling. Dessutom bör alla data sammanfattas i tabellform.

Acceptanskriterier

38. Testet måste uppfylla följande kriterier för att godkännas:

— Den parallella negativa kontrollen måste anses godtagbar för registrering i laboratoriets historiska databas över negativa kontroller enligt punkt 33.

— Parallella positiva kontroller (se punkt 24) bör framkalla reaktioner som överensstämmer med de kontroller som genereras i en historiska databasen över positiva kontroller och ge en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.

— Två olika testbetingelser (med respektive utan metabolisk aktivering) testades, utom då en av dem gav positiva resultat (se punkt 25).

— Tillräckligt många celler och koncentrationer finns tillgängliga för analys (punkterna 25, 26 och 19).

— Urvalskriterierna för toppkoncentrationen överensstämmer med de kriterier som beskrivs i punkterna 20, 21 och 22.

Utvärdering och tolkning av resultaten

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

— Åtminstone en av testkoncentrationerna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med samtidig negativ kontroll.

— Ökningen är dosrelaterad när den utvärderas med ett lämpligt trendtest.

— Något av resultaten ligger utanför fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserad 95 %-kontrollgräns, se punkt 33).

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

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

— Ingen av testkoncentrationerna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.

— Det finns ingen koncentrationsrelaterad ökning vid utvärdering med ett lämpligt trendtest.

— Alla resultat ligger inom fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser, se punkt 33).

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

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

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

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

Testrapport

44. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

— källa, satsnummer, sista förbrukningsdag om detta anges,

— testkemikaliens stabilitet i sig, om den är känd,

— löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet, om detta är känt,

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

Monokomponentämne:

— fysikaliskt tillstånd, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.

Multikomponentämne, UVCB-ämnen och blandningar:

— karakteriseras så långt som möjligt genom beståndsdelarnas kemiska identitet (se ovan), kvantitativa förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

Lösningsmedel:

— motivering av valet av lösningsmedel,

— procentandelen lösningsmedel i den slutliga odlingsmediet.

Celler:

För stamodlingar i laboratorium:

— Typ, cellinjernas källa.

— Antal passager, om känt, och laboratoriets historia.

— Kromosomernas karyotypiska egenskaper och/eller modala antal.

— Metoder för underhåll av cellodlingar.

— frånvaro av mykoplasma,

— fördubblingstid.

Testbetingelser:

— Grund för val av koncentrationer och antal odlingar inklusive t.ex. cytotoxicitetsdata och löslighetsbegränsningar.

— Mediets sammansättning, CO_2-koncentration och luftfuktighet.

— Testkemikaliens koncentration, uttryckt som slutlig koncentration i odlingsmediet (t.ex. µg eller mg/ml eller mM av odlingsmediet).

— Koncentration (och/eller volym) av det lösningsmedel och den testkemikalie som tillsätts odlingsmediet.

— inkubationstemperatur,

— inkubationstid,

— behandlingens varaktighet,

— celldensitet under behandlingen,

— typ och sammansättning hos det system som används för metabolisk aktivering (S9-källa, beredningsmetod för S9-blandningen, koncentration eller volym för S9-blandningen, S9 i det slutliga odlingsmediet, kvalitetskontroller av S9), Positiva och negativa kontrollämnen, slutkoncentrationer för varje behandlingsförhållande.

— Expressionsperiodens längd (inklusive antal celler som inokulerats samt subkulturer och scheman för näringstillförsel, om detta är tillämpligt).

— Det selektiva ämnets identitet och koncentration.

— Acceptanskriterier för testerna.

— Metoder som används för att räkna antalet viabla och muterade celler.

— Metoder för mätning av cytotoxicitet.

— All tilläggsinformation som är relevant rörande cytotoxicitet samt använd metod.

— Inkubationstidens varaktighet efter överföring till plattor.

— Kriterier för att bedöma om testresultaten är positiva, negativa eller tvetydiga.

— Metoder som använts för att bestämma pH, osmolalitet och fällningar.

Resultat:

— antal behandlade celler och antal subkultiverade celler i varje odling,

— Mätning av cytotoxicitet och övriga observationer, i förekommande fall.

— Tecken på fällning och tid för bestämningen.

— Antal celler som överförts till plattor i selektiva och icke-selektiva medier.

— Antal kolonier i icke-selektiva medier och antal resistenta kolonier i selektiva medier, samt relaterade mutantfrekvenser.

— Koncentration-responsförhållande, där det är möjligt.

— data om parallella negativa (lösningsmedel) och positiva kontroller (koncentrationer och lösningsmedel),

— Historiska negativa (lösningsmedel) och positiva kontrolldata med intervall, medelvärden, standardavvikelser och konfidensintervall (t.ex. 95 %) samt antal data.

— Statistik (för individuella odlingar och sammanslagna replikat, i förekommande fall) samt p-värden om sådana finns.

Diskussion av resultaten.

Slutsats

LITTERATUR

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, nr 234, OECD, Paris.

(2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

(3) Chu E.H.Y. och Malling H.V. (1968). Däggdjurscellers genetik. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro* , Proc. Natl. Akad. Sci., USA, s. 61, 1306–1312.

(4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. och Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagen. Res., 4, 394-403.

(5) Aaron C.S. and Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, 121–128.

(6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. and Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., s. 312, 235–239.

(7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. och Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program.Mutation Res., 196, 17-36.

(8) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. och Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. En rapport från ICPEMC:s arbetsgrupp nr 9. Mutation Res., s. 257, 147–204.

(9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. and Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297-305.

(10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, Miljö. Mutagen., s. 8, 789–886.

(11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. och Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutation Res., s. 49, 439–452.

(12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. och Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., s. 634, 177–183.

(13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., och Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. Mutation Res., 584, 1–256.

(14) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W.N, Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. and Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.

(15) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9-17.

(16) Stankowski, L. F. Jr., Tindall K.R. and Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133-147.

(17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. and Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. I: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), Cambridge University Press, s. 66–101.

(18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., och Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, Mutation Res., 86, 193-214.

(19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, Mutation Res., 85, 165-175.

(20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2*gpt*-Transformed Cells, Mol. Cell. Biol., 4, 1411-1415.

(21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., and Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. Proc Natl Acad Sci., 83(24): s. 9616-9620.

(22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manus under bearbetning.)

(23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. and Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, s. 33, 261–287.

(24) Rosen M.P., San R.H.C. och Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. s. 8, 299–305.

(25) Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. och de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 83-90.

(26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. och Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.

(27) Ames B.N., McCann J. och Yamasaki E. (1975). Ames, B. N., McCann,). and Yamasaki E. (1975), Metods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenitic Test. Mutation Res., 31, 347-364.

(28) Maron D.M. och Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., s. 113, 173–215.

(29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. and Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen. 7, 175-177.

(30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. and Sugimura T. (1976). Matsushima, T., Sawamura, M, Hara, K. och Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. I: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. and Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. och Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. Pathol. *Toxicol.*, 4, 55-65.

(32) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. och Galloway, S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., s. 28, 51–59.

(33) Unep (2001). Stockholmskonventionen om långlivade organiska föroreningar, FN:s miljöprogram (Unep). Tillgänglig på: [http://www.pops.int.html].

(34) Tan E.-L. and Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cγ Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. Mutation Res., 84, 147-156.

(35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Mammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. Environ. Mol. Mutation., 4, 7-18.

(36) Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. Environ. Mol. Mutation, s. 4, 7–18.

(37) Krahn, D.F., Barsky, F.C. och McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. I: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, s. 91–103.

(38) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. och Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen.,5, 795-801.

(39) OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). Utgiven av Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD).

(40) Brookmire L., Chen J.J. och Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, Environ. Mol. Mutation, s. 54, 36-43.

(41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances.

(42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Tillgänglig på: [https://federalregister.gov/a/2012-13774].

(43) O'Neill J.P. och Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguranine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), Mutation, Res., 59, 109-118.

(44) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., and Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. Mutation Res., 1335:2, s. 121–28.

(45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., and Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation,Res., 723, 87-90.

(46) OECD (2014). Statistik som stöd för revisionen av riktlinjerna för genotoxicitetsförsök. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 199, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., och Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. I: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(48) Fleiss J. L., Levin B., and Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Tillägg 1

DEFINITIONER

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

Kemikalie: Ett ämne eller en blandning.

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

Koncentrationer: slutliga koncentrationer av testkemikalien i odlingsmediet.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tillägg 2

FORMLER FÖR BEDÖMNING AV CYTOTOXICITET OCH MUTANTFREKVENS

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

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

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

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

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

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

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

När plattor används för kloningseffektivitet:

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

När mikrotiterplattor används för kloningseffektivitet:

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

Kloningseffektivitet = -LnP(0)/antal celler som överförts per brunn.

LnP(0) är det troliga antalet tomma brunnar av de inokulerade brunnarna och beskrivs av följande formel:

LnP(0) = -Ln (antal tomma brunnar/antal fyllda brunnar)

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

"B.22 **DOMINANT LETALT TEST PÅ GNAGARE**

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 478 (2016). Testmetoder ses regelbundet över mot bakgrund av den vetenskapliga utvecklingen, nya bestämmelser samt djurens välbefinnande. Den modifierade versionen av den här testmetoden återspeglar över trettio års erfarenhet av testet och möjligheten att integrera eller kombinera testet med andra toxicitetstester, t.ex. studier som avser utveckling, reproduktionstoxicitet eller genotoxicitet. På grund av sina begränsningar och det stora antalet djur som används är testet dock inte avsett att användas som en primärmetod utan snarare som en kompletterande testmetod som endast ska användas när de befintliga kraven inte går att uppfylla på annat sätt. Genom att kombinera olika toxicitetstester kan antalet försöksdjur som behövs för toxicitetstesterna minskas kraftigt. Ett OECD-dokument som ger kortfattad information om tester inom genetisk toxikologi och en översikt över de senaste ändringarna av dessa testriktlinjer har utarbetats (1).

2. Syftet med det dominanta letala testet (DL-försöket) är att undersöka om kemikalier producerar mutationer i form av kromosomavvikelser i könsceller. Det dominanta letala testet är även relevant för att bedöma genotoxicitet, eftersom faktorer som in vivo-metabolism, farmakokinetik och DNA-reparationsprocesser är aktiva och bidrar till responsen, även om de kan variera mellan arter. Induktion av DL-mutation efter kontakt med en testkemikalie tyder på att kemikalien har påverkat könsvävnaden hos försöksdjuret.

3. DL-mutationer dödar embryon och foster. Induktion av DL-mutation efter exponering för en testkemikalie tyder på att kemikalien har påverkat försöksdjurets könsceller.

4. Ett DL-test är användbart för att bekräfta positiva resultat från tester med somatiska in vivo-endpoints, och det är en relevant endpoint för att förutsäga faror för människor samt risk för genetiska sjukdomar som överförs via könscellerna. Detta test kräver dock ett stort antal försöksdjur och mycket arbete och är därför väldigt kostsamt och tidskrävande. Eftersom den spontana frekvensen för dominant letala mutationer är relativt hög har testet i regel begränsad känslighet för att påvisa små ökningar av mutationsfrekvensen.

5. Definitioner av centrala begrepp anges i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

6. Testet utförs oftast på möss (2) (3) (4), men andra arter, t.ex. råtta (5) (6) (7) (8), kan vara lämpliga i vissa fall om det kan motiveras vetenskapligt. DL orsakas i regel av stora kromosomavvikelser (strukturella och numeriska avvikelser) (9) (10) (11), men genmutation kan inte uteslutas. En DL-mutation är en mutation som sker i själva könscellen eller som fixeras efter befruktning i det tidiga embryot och som inte skadar könscellens funktion, men som är dödlig för det befruktade ägget eller för embryot som håller på att utvecklas.

7. Individuella hanar paras ihop sekventiellt med icke tidigare befruktade honor under lämpliga intervall. Antalet parningar efter behandling beror på det slutliga syftet med DL-försöket (punkt 23), och samtliga faser i hanens könscellsmognad ska utvärderas inför försöket (12).

8. Om det finns bevis för att testkemikalien eller dess metabolit(er) inte kommer att nå testiklarna är det inte lämpligt att använda testet.

TESTPRINCIP

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

KVALIFIKATIONSPRÖVNING AV LABORATORIET

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

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Beredningar

Val av djurart

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

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

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

Förberedelse av djuren

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

Beredning av doser

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

Testbetingelser

Lösningsmedel/vehikel

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

Positiva kontroller

16. Parallella positiva kontrolldjur bör alltid användas såvida inte laboratoriet har påvisat sin duglighet för testet i fråga och utfört testet rutinmässigt under de senaste åren (t.ex. under de senaste 5 åren). Det är dock inte nödvändigt att behandla de positiva kontrolldjuren på samma sätt som de djur som behandlas med testkemikalien, eller att ta prover på samtliga parningsintervall. De positiva kontrollämnena ska ha en känd dominant letal verkan under de förhållanden som gäller för testet. Utom vid behandling bör försöksdjuren i kontrollgrupperna hanteras på ett sätt som är identiskt med det sätt som försöksdjuren i de behandlade grupperna hanteras på.

17. Doserna av de positiva kontrollämnena bör väljas så att de ger svaga eller måttliga effekter som kritiskt bedömer resultaten och analysens känslighet, men som konsekvent ger positiva dominanta letala effekter. Exempel på positiva kontrollämnen och lämpliga doser ges i tabell 1.

Tabell 1

Exempel på positiva kontrollämnen

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

Negativa kontroller

18. Negativa kontroller, behandlade med lösningsmedel eller endast vehikel, och i övrigt behandlade på samma sätt som djuren i behandlingsgrupperna, bör inkluderas för varje provtagningstillfälle (20). I avsaknad av historiska eller publicerade kontrolldata som visar att ingen dominant letalitet eller andra deletära effekter induceras av det valda lösningsmedlet/vehiklen, bör obehandlade kontroller också inkluderas för varje provtagningstillfälle, för att fastställa acceptansen för vehikelkontrollen.

FÖRFARANDE

Antal försöksdjur

19. Enskilda hanar paras sekventiellt med lämpliga förbestämda intervall (t.ex. veckovis, se punkterna 21 och 23), företrädesvis med en icke tidigare befruktad hona. Antalet hanar per grupp bör bestämmas i förväg så att det är tillräckligt stort (i kombination med antalet parade honor vid varje parningsintervall) för att man ska uppnå den statistiska styrka som krävs för att upptäcka åtminstone en fördubbling i DL-frekvensen (punkt 44).

20. Antalet honor per parningsintervall bör också bestämmas i förväg utifrån beräkningar av statistisk styrka så att åtminstone en fördubbling i DL-frekvensen kan upptäckas (dvs. tillräckligt många befruktade honor så att minst 400 implantat erhålls) (20) (21) (22) (23) och så att minst en död implantat per analysenhet (dvs. parningsgrupp per dos) kan förväntas (24).

Administreringsperiod och parningsintervall

21. Antalet parningar efter behandling styrs av behandlingsschemat, och det måste garanteras att samtliga faser i hanens könscellsmognad utvärderas inför DL-försöket 12) (25). För en enskild behandling ska minst fem doser administreras dagligen, och 8 (möss) eller 10 (råttor) parningar ska genomföras veckovis efter den sista behandlingen. Vid administrering av flera doser kan antalet parningar reduceras i proportion till den ökade tidsperioden för administreringen, men målet att utvärdera samtliga faser av spermatogenes (efter 28 dagars exponering räcker det t.ex. med fyra parningar i veckan för att utvärdera samtliga faser av spermatogenes hos möss). Alla behandlings- och parningsscheman ska motiveras vetenskapligt.

22. Honorna ska stanna kvar hos hanarna minst så länge ägglossningscykeln varar (en vecka täcker ägglossningscykeln hos både möss och råttor). Honor som inte parat sig under ett veckointervall kan användas för nästkommande parningsintervall, eller tills parning har skett, vilket påvisas genom förekomst av sperma i vaginan eller av en vaginalpropp.

23. Exponeringen och parningsregimen styrs av syftet med DL-försöket. Om syftet är att avgöra om en given kemikalie i sig inducerar DL-mutation bör en hel spermatogenes exponeras (t.ex. för möss 7 veckors exponering med 5–7 behandlingar per vecka), och parning bör genomföras en gång i slutet. Om syftet i stället är att identifiera vilken könscellstyp som är känslig för DL-induktion är en enstaka exponering eller en 5-dagars exponering att föredra.

Dosnivåer

24. Om det inte redan finns lämpliga data som kan ge vägledning om dosval och ett förberedande test därför utförs för att fastställa koncentrationsintervallet, bör denna undersökning utföras i samma laboratorium, och med samma arter, stammar, kön och behandlingsschema som senare ska användas i huvudundersökningen (26). Syftet med undersökningen bör vara att identifiera högsta tolererbara dos (MTD), som definieras som den dos som tolereras utan bevis för toxicitet som begränsar undersökningen i förhållande till dess varaktighet (t.ex. genom att inducera minskad kroppsvikt eller hematopoietisk systemcytotoxicitet, men inte dödlighet eller tecken på smärta, lidande eller ångest som kräver human avlivning (27).

25. MTD får inte heller påverka parningsframgången negativt (21).

26. Testkemikalier med specifika biologiska verkningar vid låga icke-toxiska doser (t.ex. hormoner och mitogena ämnen) och kemikalier som uppvisar mättnad för toxikokinetiska egenskaper kan vara undantag från kriterierna för dosbestämning och bör utvärderas från fall till fall.

27. För att inhämta data om dosrespons bör en fullständig undersökning omfatta en negativ kontrollgrupp och minst tre dosnivåer som vanligen skiljer sig med en faktor 2, men inte högre än 4. Om testkemikalien inte visar toxicitet i en dosfinnande studie eller baserat på befintliga uppgifter bör den högsta dosen för engångsdosering vara 2 000 mg/kg kroppsvikt. Om testkemikalien orsakar toxicitet bör MTD vara den högsta dosen, och de dosnivåer som används bör helst omfatta ett intervall från maxdos till en dos som producerar liten eller ingen toxicitet. För icke-toxiska kemikalier med en administreringsperiod på 14 dagar eller mer är den högsta dosen (gränsdosen) 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag. För administreringsperioder på mindre än 14 dagar är den högsta dosen 2 000 mg/kg kroppsvikt/dag.

Administrering av doser

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

Observationer

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

Vävnadsinsamling och hantering

30. Honor ska avlivas under den andra halvan av dräktigheten, nämligen på dräktighetsdag (GD) 13 för möss och GD 14–15 för råttor. Livmödrarna undersöks för att fastställa dominanta letala effekter och bestämma antalet implantat, levande och döda embryon samt gulkroppar.

31. Livmoderhornen och äggstockarna blottläggs så att gulkropparna kan räknas och foster tas bort, räknas och vägas. Livmodern bör undersökas noggrant så att resorptioner som döljs av levande foster upptäcks och samtliga resorptioner kan räknas. Fosterdödlighet ska registreras. Även antalet framgångsrikt befruktade honor och det totala antalet implantat, preimplantationsförluster samt mortalitet efter implantation (inklusive tidiga och sena resorptioner) ska registreras. Synliga foster kan bevaras i Bouins lösning i minst två veckor och därefter undersökas för större yttre missbildningar (28), i syfte att ge ytterligare information om testämnets effekter på reproduktion och utveckling.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

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

33. Postimplantationsförlusten beräknas genom dödskvoten för det totala antalet implantat i den behandlade gruppen i förhållande till dödskvoten för det totala antalet implantat i gruppen med vehikel-/lösningsmedelskontroll.

34. Preimplantationsförlusten beräknas som skillnaden mellan antalet gulkroppar och antalet implantat eller som en minskning av det genomsnittliga antalet implantat per hona i jämförelse med kontrollparningarna. Om preimplantationsförlusten uppskattas ska värdet rapporteras.

35. Den dominanta letala faktorn (DL-faktorn) beräknas enligt följande: (dödsfall efter implantation/totalt antal implantationer per hona) × 100.

36. Uppgifter om toxicitet och kliniska tecken (enligt punkt 29) ska redovisas.

Acceptanskriterier

37. Följande kriterier avgör om testet är godtagbart.

— Parallella negativa kontroller stämmer överens med publicerade normer för historiskt negativa data, och laboratoriets historiska kontrolldata finns tillgängliga (se punkterna 10 och 18).

— Parallella positiva kontroller framkallar reaktioner som överensstämmer med publicerade normer för historiskt positiv kontrolldata, eller med laboratoriets historiska positiva kontrolldatabas om en sådan finns, och genererar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den negativa kontrollen (se punkterna 17 och 18).

— Ett tillräckligt antal implantat och doser ska ha analyserats (punkt 20).

— Urvalskriterierna för högsta dos överensstämmer med de kriterier som beskrivs i punkterna 24 och 27.

Utvärdering och tolkning av resultaten

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

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

— Åtminstone en av testdoserna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.

— Ökningen är dosrelaterad under åtminstone en testbetingelse (t.ex. ett veckovis parningsintervall) vid utvärdering med ett lämpligt test. och

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

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

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

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

— Det finns ingen dosrelaterad ökning under någon testbetingelse. och

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

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

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

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

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

44. Statistiska tester som används bör betrakta hanen som den experimentella enheten. Även om data som avser antal (t.ex. antal implantat per hona) kan distribueras enligt Poisson-metoden och även om proportionerna (t.ex. proportionen döda implantat) kan distribueras binomialt brukar sådana data ofta vara överdispergerade (31). Den statistiska analysen bör därför inledas med ett test av över- respektive underdispergering med hjälp av ett varianstest i form av t.ex. Cochrans binomiala varianstest (32) eller Tarones C(α)-test för binomial överdispergering (31) (33). Om inga avvikelser från den binomiala dispergeringen detekteras kan proportionstrender över dosnivå testas med hjälp av Cochran-Armitage trendtest (34), och parvis jämförelser kan göras med kontrollgruppen med hjälp av Fishers signifikanstest (35). Även om inga avvikelser från Poissons dispergering detekteras kan beräkningen testas för trender genom användning av Poissons regression (36), och parvis jämförelser kan göras med kontrollgruppen enligt Possion-modellen genom att parvisa kontraster används (36). Om en betydande över- eller underdispergering upptäcks rekommenderas icke-parametriska metoder (23) (31). Dessa omfattar rankbaserade tester, t.ex. Jonckheere-Terpstra-testet för trender (37) och Mann-Whitney-testet (38) för parvisa jämförelser med gruppen med vehikel-/lösningsmedelskontroll, liksom permutation, ny provtagning eller bootstraptester för trender och parvisa jämförelser med kontrollgruppen (31) (39).

45. Ett positivt DL-försök tyder på att testkemikalien har genotoxisk verkan på könscellerna hos den behandlade hanen av den testade arten.

46. Prövning av om de observerade värdena ligger inom eller utanför det historiska kontrollområdet kan ge vägledning för att utvärdera responsens biologiska betydelse (40).

Testrapport

47. Testrapporten ska innehålla följande information:

Sammanfattning.

Testkemikalie:

— källa, satsnummer, sista förbrukningsdag om detta anges,

— testkemikaliens stabilitet i sig, om den är känd,

— löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet, om detta är känt,

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

Monokomponentämne:

— fysikaliskt tillstånd, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.

Multikomponentämne, UVCB-ämnen och blandningar:

— karakteriseras så långt som möjligt genom beståndsdelarnas kemiska identitet (se ovan), kvantitativa förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

Beredning av testkemikalien:

— motivering för val av vehikel.

— Löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt.

— Beredning av foder, dricksvatten eller inandningsberedningar.

— Analytiska bestämningar av beredningar (t.ex. stabilitet, homogenitet, nominella koncentrationer) om sådana görs.

Försöksdjur:

— Art/stam som används och motivering av valet.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Ursprung, inhysning, foder osv.

— Metod för unik identifiering av djuren.

— För korttidsstudier: Individuell vikt hos försöksdjuren vid försökets början och vid slutet av testet. För undersökningar som varar längre än en vecka: Individuella kroppsvikter under studien och foderförbrukning. Kroppsviktsintervallet, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp bör inkluderas.

Testbetingelser:

— Positiva och negativa kontrolldata (vehikel/lösningsmedel).

— Data från den dosfinnande studien.

— Grund för valet av dosnivå.

— Uppgifter om beredning av testkemikalien.

— Uppgifter om administreringen av testkemikalien.

— Grund för administreringsväg.

— Metoder för mätning av djurtoxicitet, inklusive, i förekommande fall, histopatologiska eller hematologiska analyser och frekvensen av djurobservationer och mätningar av djurens kroppsvikt.

— Metoder för att verifiera att testkemikalien nått målvävnaden eller den allmänna cirkulationen om negativa resultat erhålls.

— Faktisk dos (mg/kg kroppsvikt/dag) som beräknats genom dietens/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (ppm) och konsumtion, i tillämpliga fall.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

— Uppgifter om miljöberikning i burarna.

— Detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman samt motivering av valen.

— Smärtlindringsmetod.

— Metod för avlivning.

— Förfaranden för att isolera och bevara vävnader.

— Ursprungs- och partinummer för alla satser och reagenser (i förekommande fall).

— Metoder för räkning av DL-mutanter.

— Parningsschema.

— Metod för bestämning av om parning skett.

— Avlivningstid.

— Kriterier för gradering av DL-effekter, inklusive gulkroppar, implantat, resorptioner, preimplantationsförluster samt levande och döda implantat.

Resultat:

— Djurens kondition före och under hela testperioden, inklusive tecken på toxicitet.

— Hanarnas kroppsvikt under behandlings- och parningsperioderna.

— Antal parade honor.

— Dos/respons-förhållandet, där detta är möjligt.

— Data från jämsides behandlad och tidigare negativ kontroll med omfång, medelvärden och standardavvikelser.

— Parallella positiva kontrolldata.

— Tabelldata för varje moderdjur inklusive: Antal gulkroppar per moderdjur. Antal implantat per moderdjur. Antal resorptioner och preimplantationsförluster per moderdjur. Antal levande implantat per moderdjur. Antal döda implantat per moderdjur. Fostervikter.

— En summering av ovanstående data för varje parningsperiod och dos, med DL-frekvenser.

— De statistiska analyser och metoder som använts.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser

LITTERATURHÄNVISNINGAR

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, nr 234, OECD, Paris.

(2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.* (Eds.) s. 235–334, Elsevier, Amsterdam

(3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., och Wiemann, H. (1978). Standardprotokoll för DL-försök på hanmöss. Sammanställt av arbetsgruppen "Dominant" lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol.*, s. 39, 173–185.

(4) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. Mutation Res, 352:159–167.

(5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. och Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. Mutation Res., 48:267–270.

(6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. och Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. Mutation Res., 397:77-74.

(7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. och Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol.* Lett. 20:325-329.

(8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. och Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. Fundam. Appl. *Toxicol.*, 3:80–85.

(9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., och Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, Mutation Res., s. 33, 239–249.

(10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. och Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616–624.

(11) Marchetti F. och Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. Birth Defects Res., 75:112–129.

(12) Adler, I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. Mutation Res., 352:169-172.

(13) Favor J., och Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, Mutation Res., 53: s. 21-27.

(14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. och Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. Mutation Res., 345:167-180.

(15) Hastings S.E., Huffman K.W. och Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, Mutation Res., 40:371–378.

(16) James D.A. och Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, Mutation Res., 99:303–314.

(17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. och Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. Mutation Res., 173:35-40.

(18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. and Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, Mutation Res., 296: s. 143-156.

(19) Holstrom L.M., Palmer A.K. och Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, s. 129–156.

(20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. och Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417:19–30.

(21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312:313-318.

(22) Generoso W.M. och Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. Methods, *Toxicol.*, 3A:124–141.

(23) Haseman J.K. och Soares E.R. (1976). The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. Mutation. Res., 41: s. 277-288.

(24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, Teratogen. Carcinogen. *Mutagen.*,1:353–360.

(25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., och Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. Mutation. Res., 85:417–429.

(26) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Rapport från det brittiska toxikologisällskapet/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagen., 7:313–319.

(27) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.19.), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(28) Barrow M.V., Taylor W.J. och Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, s. 127, 291–306.

(29) Kirkland D.J., (Ed.) (1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.

(30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. och Thybaud V. (2011). "Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data", Mutation. Res., 723:87–90.

(31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. and Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. Mutation. Res.., 272:35–58.

(32) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. Biometrics, 10: s. 417-451.

(33) Tarone, R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: s. 585-590.

(34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. I: *Encyclopedia of* Statistical Sciences, volym 9, Kotz S. och Johnson N. L. (Eds.), s. 334–336. John Wiley and Sons, New York.

(35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London.

(36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, Chapters 14 and 17. McGraw-Hill, Boston

(37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika,* 41:133–145.

(38) Conover W.J. (1971). Praktisk icke-parametrisk statistik. John Wiley and Sons, New York

(39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.

(40) Fleiss J. (1973). Statistiska metoder för gradering och proportioner. John Wiley and Sons, New York.

Tillägg 1

DEFINITIONER

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

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

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

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

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

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

Postimplantationsförlust: kvoten döda implantat i den behandlade gruppen jämfört med dödskvoten bland samtliga implantat i kontrollgruppen.

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

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

Tillägg 2

TIDSFÖRLOPP FÖR SPERMATOGENESEN HOS DÄGGDJUR

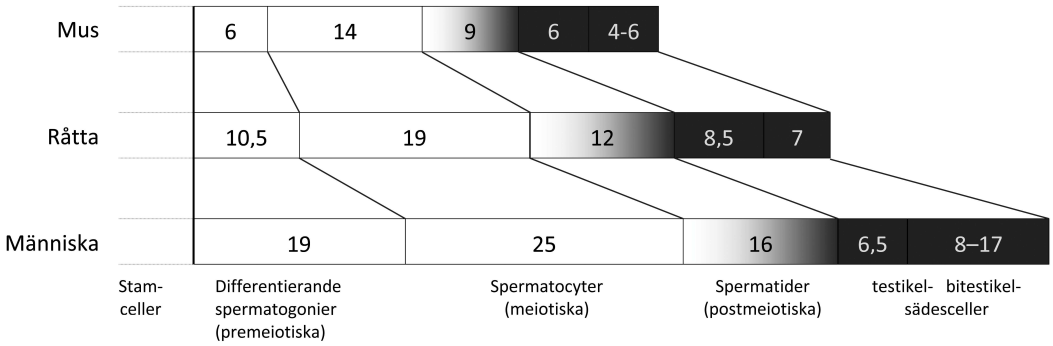


Fig. 1: En jämförelse av tiden (antal dagar) det tar för hanliga könsceller att utvecklas i möss, råttor och människor. Ingen DNA-reparation sker under de skuggade perioderna.

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

Litteraturhänvisningar

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

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

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

"B.23 **SPERMATOGONIALT TEST AV KROMOSOMAVVIKELSER HOS DÄGGDJUR**

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 483 (2016). Testmetoder ses regelbundet över med avseende på vetenskaplig utveckling, nya bestämmelser samt djurens välbefinnande. Den modifierade versionen av den här testmetoden återspeglar många års erfarenhet av att använda det här testet och visar testets potential för att integreras och kombineras med andra toxicitets- eller genotoxicitetstest. Genom att kombinera olika toxicitetstest kan antalet försöksdjur som behövs för toxicitetstestet potentiellt minskas kraftigt. Denna testmetod är en del av en serie av testmetoder för genetisk toxikologi. Ett OECD-dokument som ger kortfattad information om tester inom genetisk toxikologi och en översikt över de senaste ändringarna av dessa testriktlinjer har utarbetats (1).

2. Syftet med testet av spermatogoniala kromosomavvikelser in vivo hos däggdjur är att identifiera kemikalier som orsakar strukturella kromosomavvikelser i spermatogoniala celler hos däggdjur (2) (3) (4). Detta test är dessutom relevant för bedömning av genotoxicitet eftersom faktorer rörande in vivo-metabolism, farmakokinetik och DNA-reparationsprocesser är aktiva och bidrar till responsen, även om de kan variera mellan olika arter. Denna testmetod är inte avsedd att mäta numeriska avvikelser, och testet används i regel inte i detta syfte.

3. Det här testet mäter strukturella kromosomavvikelser (av både kromosom- och kromatidtyp) i spermatogoniala könsceller som är under delning och förväntas därför kunna förutsäga induktion av ärftliga mutationer i dessa könsceller.

4. Definitioner av centrala begrepp anges i tillägget.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

5. Gnagare används rutinmässigt i detta test, men även andra arter kan i vissa fall vara lämpliga om det är vetenskapligt motiverat. Standardcytogenetiska beredningar av testiklar från gnagare genererar mitotiska (spermatogonier) och meiotiska (spermatocyter) metafaser. Mitotiska och meiotiska metafaser identifieras utifrån kromosomernas morfologi (4). Detta cytogenetiska in vivo-test används för att påvisa strukturella kromosomavvikelser i spermatogoniala mitoser. Andra målceller omfattas inte av denna metod.

6. För att upptäcka avvikelser beträffande kromatidtyp i spermatogoniala celler bör den första mitotiska celldelningen efter behandlingen undersökas innan dessa avvikelser omvandlas till avvikelser av kromosomtyp i de efterföljande celldelningarna. En meiotisk kromosomanalys avseende strukturella kromosomavvikelser i diakines–metafas I och metafas II kan ge ytterligare information om behandlade spermatocyter.

7. Det finns flera generationer av spermatogonier i testiklarna (5), och dessa olika könscellstyper kan uppvisa olika känslighet för kemisk behandling. De avvikelser som upptäcks utgör därför en samlad respons på behandlade spermatogoniala cellpopulationer. Majoriteten av de mitotiska cellerna i testikelberedningarna utgörs av B-spermatogonier, som har en cellcykel på ungefär 26 h (3).

8. Om det finns bevis för att testkemikalien eller dess metabolit(er) inte kommer att nå testiklarna är det olämpligt att använda detta test.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

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

KVALIFIKATIONSPRÖVNING AV LABORATORIET

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

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Beredningar

Val av djurart

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

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

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

Förberedelse av djuren

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

Beredning av doser

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

Testbetingelser – Lösningsmedel/vehikel

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

Positiva kontroller

16. Parallella positiva kontrolldjur bör alltid användas såvida inte laboratoriet har påvisat sin duglighet för testet i fråga och utfört testet rutinmässigt under de senaste åren (t.ex. under de senaste 5 åren). Om en parallell positiv kontrollgrupp inte ingår bör klassificeringskontroller (fasta och ofläckade utstryksglas) inkluderas i varje försök. Detta kan åstadkommas genom att inbegripa lämpliga referensprover i klassificeringen av undersökningen som har erhållits och lagrats från ett separat positivt kontrollförsök som utförs med jämna mellanrum (t.ex. var 6:e till 18:e månad) på det laboratorium där testet utförs, t.ex. under kvalifikationsprövning och vid behov med jämna mellanrum därefter.

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

Tabell 1

I tabellen nedan ges några exempel på positiva kontrollämnen

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

Negativa kontroller

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

FÖRFARANDE

Antal försöksdjur

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

Behandlingsschema

20. Testkemikalierna administreras i regel vid ett tillfälle (dvs. enstaka behandling), men andra doseringsmetoder kan användas under förutsättning att de är vetenskapligt motiverade.

21. I den högsta dosgruppen används två provtagningstider efter behandlingen. Eftersom den tid som krävs för upptag och metabolism av testkemikalien såväl som dess effekt på cellcykelns kinetik kan påverka den optimala tiden för detektion av kromosomavvikelser rekommenderas en tidig och en sen provtagning, ca 24 respektive 48 timmar efter behandling. För övriga doser än maxdosen ska en tidig provtagning göras 24 timmar efter behandlingen (kortare eller lika lång som cellcykeltiden för B-spermatogonier och därför optimal för att detektera de första metafaserna efter behandlingen), om ingen annan provtagningstid anses mer lämplig och därför är motiverad.

22. Andra provtagningstider kan användas. När det t.ex. gäller fall där kemikalier kan ge upphov till S-oberoende effekter, kan tidigare provtagningstider (dvs. kortare än 24 h) vara lämpliga.

23. En behandling med upprepade doser kan användas, t.ex. i kombination med ett test avseende en annan endpoint för vilket en 28 dagars administreringsperiod används (t.ex. TM B.58), men i så fall behövs ytterligare djurgrupper för att förena olika provtagningstider. Det måste fastställas att ett sådant schema är vetenskapligt lämpligt och motiveras från fall till fall.

24. Innan djuren avlivas bör de injiceras intraperitonealt med en lämplig dos av ett ämne som stoppar celldelningen i metafas (t.ex. kolkemid® eller kolchicin). Provtagning på försöksdjur sker därefter med lämpliga intervall. För möss och råttor är detta intervall ca 3–5 timmar.

Dosnivåer

25. Om det inte finns lämpliga data från andra relevanta undersökningar som kan ge vägledning om dosval och en preliminär undersökning därför utförs för att fastställa omfattningen, bör denna undersökning utföras i samma laboratorium och med samma arter, stammar, kön och behandlingsschema som senare ska användas i huvudundersökningen enligt gällande rekommendationer för dosfinnande studier (12). Syftet med undersökningen bör vara att identifiera högsta tolererbara dos (MTD), som definieras som den dos som inducerar små toxiska effekter i förhållande till undersökningsperiodens varaktighet (t.ex. onormalt beteende eller onormala reaktioner, mindre viktminskningar eller hemapatopoietisk cytotoxicitet) men inte dödlighet eller tecken på smärta, lidande eller ångest, vilket kräver avlivning av försöksdjuren i fråga (13).

26. Den högsta dosen kan även definieras som en dos vilken ger upphov till någon indikation på toxicitet i de spermatogoniala cellerna (t.ex. en reduktion i kvoten av spermatogoniala mitoser hos den första och den andra meiotiska metafasen). Denna reduktion bör inte överskrida 50 %.

27. Testkemikalier med specifika biologiska verkningar vid låga icke-toxiska doser (t.ex. hormoner och mitogena ämnen) och kemikalier som uppvisar mättnad för toxikokinetiska egenskaper kan vara undantag från kriterierna för dosbestämning och bör utvärderas från fall till fall.

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

Administrering av doser

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

Observationer

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

Kromosompreparation

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

Analys

32. Minst 200 väl spridda metafaser bör graderas för varje djur (3) (11). Om den historiska negativa kontrollfrekvensen är < 1 %, bör mer än 200 celler graderas per djur för att öka den statistiska styrkan (3). Infärgningsmetoder som tillåter identifiering av centromeren ska användas.

33. Avvikelser av kromatid- och kromosomtyp bör registreras separat och klassificeras enligt subtyper (brott, utbyten). Luckor ska registreras men inte tas med i bedömningen av huruvida en kemikalie orsakar en betydande ökning i antal celler med kromosomavvikelser. Laboratoriets förfaranden ska säkerställa att analysen av kromosomavvikelser utförs av välutbildade bedömare. Eftersom beredningen av utstryksglas ofta resulterar i brott på en del av de celler som är i metafas med förlust av kromosomer som följd, bör de celler som påträffas därför innehålla ett centromererantal på minst $2n \pm 2$, där n är antalet haploider för kromosomerna hos den arten.

34. Även om syftet med testet är att detektera strukturella kromosomavvikelser, är det viktigt att notera frekvenserna för polyploidi och endoreduplikation när dessa händelser observeras (se punkt 44).

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

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

36. Data om toxicitet och kliniska tecken (enligt punkt 30) ska redovisas.

Acceptanskriterier

37. Följande kriterier avgör om testet är godtagbart.

— Parallella negativa kontroller stämmer överens med publicerade normer för historiskt negativa data, vilka i regel förväntas ligga på > 0 % och $\leq 1{,}5$ % celler med kromosomavvikelser, samt med laboratoriets historiska kontrolldata, om sådana finns (se punkterna 10 och 18).

— Parallella positiva kontroller framkallar responser som överensstämmer med publicerade normer för historiskt positiva kontrolldata, eller med laboratoriets historiska positiva kontrolldatabas om en sådan finns, och genererar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den negativa kontrollen (se punkterna 17 och 18).

— Ett tillräckligt antal celler och doser ska ha analyserats (se punkterna 28 och 32).

— Urvalskriterierna för högsta dos överensstämmer med de kriterier som beskrivs i punkterna 25 och 26.

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

Utvärdering och tolkning av resultaten

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

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

— Åtminstone en av testdoserna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.

— Ökningen är dosrelaterad vid minst ett provtagningstillfälle.

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

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

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

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

— Det finns ingen dosrelaterad ökning under någon testbetingelse. och

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

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

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

43. Om responsen varken är tydligt negativ eller positiv bör uppgifterna utvärderas av en expert och/eller ytterligare undersökningar genomföras med tillgängliga försöksdata, i syfte att etablera resultatets biologiska relevans (t.ex. vid en svag ökning eller en ökning som är på gränsen) och för att avgöra om det positiva resultatet faller utom de acceptabla värdena för negativa kontrolldata, eller utanför laboratoriets historiska negativa kontrolldata (19).

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

45. En ökning av antalet polyploida celler kan tyda på att testkemikalien har potential att inhibera mitotiska processer och att inducera numeriska kromosomavvikelser (20). En ökning av antalet celler med endoreduplicerade kromosomer kan tyda på att testkemikalien har potential att inhibera cellcykelns fortskridande (21) (22), vilket är en annan slags mekanism för induktion av numeriska kromosomförändringar än inhibition av mitotiska processer (se punkt 2). Därför bör förekomsten av polyploida celler och celler med endoreduplicerade kromosomer registreras separat.

Testrapport

46. Testrapporten ska innehålla följande information:

Sammanfattning.

Testkemikalie:

— källa, satsnummer, sista förbrukningsdag om detta anges,

— testkemikaliens stabilitet i sig, om den är känd,

— löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet, om detta är känt,

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

Monokomponentämne:

— fysikaliskt tillstånd, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,

— kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.

Multikomponentämne, UVCB-ämnen och blandningar:

— karakteriseras så långt som möjligt genom beståndsdelarnas kemiska identitet (se ovan), kvantitativa förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

Beredning av testkemikalien:

— Motivering för val av vehikel.

— Löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet/vehikeln.

— Beredning av foder, dricksvatten eller inandningsberedningar.

— Analytiska bestämningar av beredningar (t.ex. stabilitet, homogenitet, nominella koncentrationer) om sådana görs.

Försöksdjur:

— art/stam som används och motivering av valet.

— Antal djur och deras ålder.

— Ursprung, inhysning, foder osv.

— Metod för unik identifiering av djuren.

— För korttidsstudier: Individuell vikt hos försöksdjuren vid testets början och slut. För undersökningar som varar längre än en vecka: Individuella kroppsvikter under studien och foderförbrukning. Kroppsviktsintervallet, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp bör inkluderas.

Testbetingelser:

— Positiva och negativa kontrolldata (vehikel/lösningsmedel).

— Data från en preliminär undersökning, om en sådan har utförts.

— Grund för valet av dosnivå.

— Grund för administreringsväg.

— Uppgifter om beredning av testkemikalien.

— Uppgifter om administreringen av testkemikalien.

— Grund för avlivningstider.

— Metoder för mätning av djurtoxicitet, inklusive, i förekommande fall, histopatologiska eller hematologiska analyser och frekvensen av djurobservationer och mätningar av djurens kroppsvikt.

— Metoder för att verifiera att testkemikalien nått målvävnaden eller den allmänna cirkulationen om negativa resultat erhålls.

— Faktisk dos (mg/kg kroppsvikt/dag) som beräknats genom dietens/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (ppm) och konsumtion, i tillämpliga fall.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

— Detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman samt motivering av valen.

— Avlivningsmetod.

— Smärtlindringsmetod (i förekommande fall).

— Förfaranden för att isolera vävnader.

— Identitet hos kemikalie som stoppar cellcykeln i metafas, dess koncentration och behandlingens varaktighet.

— Metoder för preparation av utstryksglas.

— Kriterier för hur avvikelser påvisas.

— Antalet analyserade celler per försöksdjur.

— Kriterier för bedömning av om undersökningarna är positiva, negativa eller tvetydiga.

Resultat:

— Djurens kondition före och under hela testperioden, inklusive tecken på toxicitet.

— Kropps- och organvikt vid avlivning (om flera behandlingar används ska även kroppsvikter under behandlingarna kontrolleras).

— Tecken på toxicitet.

— Mitosindex:

— Omfattning av spermatogoniala celler vid första och andra meiotiska metafasen, eller annat bevis på att målvävnaden har exponerats.

— Typ av och antal avvikelser, angivna separat för varje försöksdjur.

— Totalt antal avvikelser per grupp med medelvärden och standardavvikelser.

— Antal celler med avvikelser per grupp med medelvärden och standardavvikelser.

— Dos/respons-förhållandet, där detta är möjligt.

— De statistiska analyser och metoder som använts.

— Samtidiga negativa kontrolldata.

— Historiska negativa kontrolldata med intervall, medelvärden, standardavvikelser, samt ett 95 % konfidensintervall (i förekommande fall) eller publicerad historiska negativa kontrolldata som använts för att godkänna testresultaten.

— Parallella positiva kontrolldata.

— Förändringar i ploiditet om sådana påvisas, inklusive frekvenser för polyploida och/eller endoreduplicerade celler.

Diskussion av resultaten

Slutsats

LITTERATUR

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris

(2) Adler, I.-D. (1984). Adler, I. D. (1984), Cytogenetic tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Venitt och J. M. Parry (eds). IRL Press, Oxford, Washington DC, s. 275–306.

(3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.

(4) Russo, A (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.

(5) Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. I: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-15.

(6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379.Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C, Lambert, B. and Magnusson, J. (eds) Liss, New York, pp. 477-484.

(7) Cattanach, B.M., och Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.

(8) Cattanach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.

(9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.

(10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): s. 313–324.

(11) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. och Hayashi, M. (1998). Recommendations for statistical designs of *In Vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Res.,417, s. 19–30.

(12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. och Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, s. 313–319.

(13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19.), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(14) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, s. 207–209.

(15) Hsu, T.C., Elder, F. och Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. Miljö. Mutagen., 1, s. 291–294.

(16) Evans, E.P., Breckon, G., och Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, s. 289–294.

(17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. och Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays, i: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115–141.

(18) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. och Savage, J. R. K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, i: D. J. Kirkland (ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Dala. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

(19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. och Thybaud, V. (2011). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. Mutation Res., 723, s. 87–90.

(20) Warr T.J., Parry E.M. och Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, Mutation Res., 287, 29-46.

(21) Huang, Y., Change, C. och Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. Cancer Res., 43, s. 1362–1364.

(22) Locke-Huhle, C (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. Mutation Res., vol. 119, s. 403–413.

Tillägg

DEFINITIONER

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

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

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 430 (2015). Hudkorrosion innebär att det uppstår en irreversibel skada på huden i form av synlig nekros genom epidermis och in i dermis, efter applicering av en testkemikalie (enligt definitionen i Förenta nationernas globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (1) och Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP-förordningen) ([1])). Den uppdaterade testmetoden B.40 är en in vitro-metod för att identifiera frätande och icke frätande ämnen och blandningar i enlighet med GHS (1) och CLP.

2. Bedömningen av hudkorrosivitet har i regel inneburit användning av försöksdjur (TM B.4, likvärdig med OECD TG 404 som antogs 1981 och reviderades 1992, 2002 och 2015) (2). Utöver den föreliggande metoden TM B.40 har andra in vitro-metoder för testning av kemikaliers potential att orsaka hudkorrosion validerats och antagits, t.ex. TM B.40a (likvärdig med OECD TG 431) (3) och TM B.65 (likvärdig med OECD TG 435) (4), vilka också kan identifiera underkategorier av frätande kemikalier om så krävs. Flera validerade in vitro-testmetoder har antagits, t.ex. TM B.46 (likvärdig med OECD TG 439 (5)), för att användas i tester avseende hudirritation. I OECD:s vägledningsdokument om ett integrerat synsätt på testning och bedömning (IATA) av hudkorrosion och hudirritation beskrivs flera moduler som grupperar olika informationskällor och analysverktyg, och där ges också i) vägledning om hur tillgängliga testdata och icke testdata kan integreras och användas i bedömningen av kemikaliers potential för hudirritation och hudkorrosion, och ii) förslag på hur man ska gå till väga när det krävs ytterligare testning (6).

3. Denna testmetod gäller endpointen hudkorrosion hos människa. Den baseras på testmetoden TER, som testar transkutant elektriskt motstånd i råtthud och där hudbitar används för att identifiera frätande ämnen utifrån deras förmåga att skada den normala integriteten hos hudens hornlager och försämra dess barriärfunktion. OECD:s motsvarande testriktlinje antogs första gången 2004 och uppdaterades 2015 för att överensstämma med vägledningsdokumentet om IATA.

4. För att utvärdera in vitro-testning av hudkorrosion för lagstadgade ändamål utfördes förvalideringsstudier (7) följt av en formell valideringsstudie av TER-testmetoden för bedömning av hudkorrosion på råtthud (8) (9) (10) (11). Resultaten av dessa studier ledde till rekommendationen att TER-testmetoden (som betecknas validerad referensmetod – VRM) kunde användas för lagstadgade ändamål i syfte att bedöma hudkorrosivitet in vivo (12) (13) (14).

5. Innan en annan, liknande eller modifierad, in vitro-TER-testmetod för hudkorrosion än VRM kan användas för lagstadgade ändamål måste metodens tillförlitlighet, relevans (noggrannhet), och begränsningar för det föreslagna syftet bestämmas för att garantera dess likhet med VRM i enlighet med kraven i prestandastandarderna (PS) (15). OECD:s ömsesidiga dataacceptans kan endast garanteras efter att eventuella föreslagna testmetoder, nya eller uppdaterade, som följer PS har granskats och inkluderats i motsvarande OECD-testriktlinjer.

DEFINITIONER

6. Definitioner av begreppen finns i tillägget.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

7. En valideringsstudie (10) och andra publicerade studier (16) (17) har visat att TER-testmetoden för råtthud kan skilja mellan ämnen som man vet är frätande respektive icke frätande för huden med en generell känslighet på 94 % (51/54) och en specificitet på 71 % (48/68) från en databas med 122 ämnen.

([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).

8. Denna testmetod gäller hudkorrosion in vitro. Den möjliggör identifiering av frätande och icke frätande testkemikalier i enlighet med GHS/CLP. En begränsning med testmetoden som påvisats i valideringsstudierna (8) (9) (10) (11) är att den inte tillåter underkategorisering av frätande ämnen och blandningar i enlighet med GHS/CLP. Gällande regelverk inom området avgör hur testmetoden kommer att användas. Denna testmetod ger visserligen inte adekvat information om hudirritation, men det bör nämnas att TM B.46 är särskilt avsedd för hälsoeffekten hudirritation in vitro (5). För en fullständig bedömning av lokala effekter på huden efter en enstaka dermal exponering, se OECD:s vägledningsdokument om IATA (6).

9. Ett stort spektrum av kemikalier som framför allt motsvarar ämnen har testats vid den validering som ligger till grund för denna testmetod, och valideringsstudiens empiriska databas uppgick till totalt 60 ämnen och omfattade en mängd olika kemiska klasser (8) (9). Utifrån de samlade data som finns tillgängliga är testmetoden tillämplig på en mängd olika kemiska klasser och fysikaliska tillstånd, inklusive vätskor, halvfasta ämnen, fasta ämnen och vaxer. Det bör nämnas att ett jämförelsevis litet antal vaxer och frätande fasta ämnen bedömdes under valideringen. Detta beror på att det är svårt att få fram testobjekt med lämpliga referensdata för vissa fysikaliska tillstånd. Vätskorna kan vara vattenbaserade eller inte. fasta ämnen kan vara lösliga eller olösliga i vatten. Om det finns bevis för att testmetoden inte är tillämplig på en specifik ämneskategori bör den inte användas för denna kategori. Eftersom denna testmetod är applicerbar på ämnen anses den även kunna användas för blandningar. Med tanke på att blandningar omfattar ett brett spektrum av kategorier och sammansättningar och det i nuläget endast finns begränsad information om testning av blandningar bör dock testmetoden inte användas på blandningskategorier för vilka den har visat sig vara icke-applicerbar (t.ex. i enlighet med den strategi som föreslås av Eskes m.fl., 2012) (18). Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag. Gaser och aerosoler har ännu inte bedömts genom valideringsstudier (8) (9). Även om det är tänkbart att de kan testas med TER-testmetoden så tillåter den aktuella testmetoden inte testning av gaser och aerosoler.

TESTPRINCIP

10. Testkemikalien appliceras och får verka i upp till 24 timmar på den epidermala ytan av hudbitar i ett testsystem med två kammare där hudbitarna fungerar som skiljemembran mellan kamrarna. Hudbitarna tas från humant avlivade, 28–30 dagar gamla råttor. Frätande kemikalier identifieras genom sin förmåga att försämra hornlagrets normala integritet och barriärfunktion, vilket kan mätas som en minskning av det transkutana elektriska motståndet (TER) under ett visst tröskelvärde (16) (se punkt 32). För TER för råtthud har man valt ett brytvärde på 5kΩ, baserat på omfattande data för ett brett urval av ämnen där den absoluta majoriteten av värdena antingen låg klart över (ofta > 10kΩ) eller klart under (ofta < 3kΩ) detta värde (16). I allmänhet sänker testkemikalier som inte har någon frätande verkan på djur inte TER under detta brytvärde, oavsett om de orsakar hudirritation eller inte. Vidare kan användning av andra hudberedningar eller annan utrustning ändra brytvärdet, vilket kräver ytterligare validering.

11. Ett färgämnesbindningssteg ingår i testförfarandet för verifiering av positiva resultat vid TER-värden runt 5 kΩ. Färgämnesbindningssteget visar om ökningen av jonpermeabiliteten beror på fysisk nedbrytning av hornlagret. TER-metoden med råtthud har visat sig kunna förutsäga in vivo-korrosivitet på kanin, fastställd enligt testmetod B.4 (2).

DEMONSTRATION AV KOMPETENS

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

Tabell 1

Lista på kvalifikationsämnen ([1])

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

Förkortningar: aq = vattenbaserad, CAS-nr = Chemical Abstracts Service Registry Number, VRM = validerad referensmetod, C = frätande, NC = icke frätande

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

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

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

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

FÖRFARANDE

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

Djur

14. Råttor ska användas eftersom deras hud har en påvisad känslighet mot ämnena i den här testmetoden (12) och eftersom deras hud är den enda hudkälla som har validerats formellt (8) (9). Åldern (då huden tas till vara) och råttstammen är av särskild betydelse för att säkerställa att hårsäckarna är i vilofas innan den vuxna hårtillväxten börjar.

15. Rygg- och flankhår från unga, ungefär 22 dagar gamla han- eller honråttor (erhållna från Wistar eller en jämförbar stam) avlägsnas noggrant med en liten sax. Därefter tvättas djuren noga och torkas sedan omsorgsfullt medan det klippta området hålls ner i antibiotikalösning (som innehåller t.ex. streptomycin, penicillin, kloramfenikol och amfotericin, i koncentrationer som hämmar bakterietillväxt). Djuren tvättas på nytt med antibiotika på tredje eller fjärde dagen efter den första tvätten och används inom tre dagar från den andra tvätten, då hornlagret har återhämtat sig från hårborttagningen.

Beredning av hudbitar

16. Djuren avlivas med en human metod när de är 28–30 dagar gamla. Åldern är av stor betydelse. Huden från rygg och flank från varje djur avlägsnas sedan, och överflödet av underhudsfett skrapas försiktigt bort från huden. Hudbitar med en diameter på ungefär 20 mm tas ut. Hudbitarna kan lagras innan de används om det kan visas att positiva och negativa kontrolldata är likvärdiga med dem som erhålls för färsk hud.

17. Varje hudbit placeras över änden av ett PTFE-rör (polytetrafluoreten) så att överhuden är i kontakt med röret. En o-ring i gummi presspassas över rörets ände för att hålla huden på plats och överflödig vävnad putsas bort. O-ringen i gummi förseglas sedan till PTFE-rörets ände med vaselin. Röret fästs med en fjäderklämma i en kammare som innehåller $MgSO_4$-lösning (154 mM) (figur 1). Hudbiten ska vara helt nedsänkt i $MgSO_4$-lösningen. Upp till 10–15 hudbitar kan erhållas från en enda råtthud. Rörets och o-ringens mått visas i figur 2.

18. Innan testningen börjar mäts de båda hudbitarnas elektriska motstånd som ett kvalitetskontrollförfarande för varje djurhud. Båda bitarna ska ge värden för motståndet som är större än 10 kΩ för att återstoden av hudbitarna ska kunna användas för testet. Om motståndet är mindre än 10 kΩ ska återstående hudbitar från den aktuella huden kastas.

Applicering av testkemikalie och kontrollämnen

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

20. Testkemikalier i vätskeform (150 µl) appliceras jämnt på hudytan inuti röret. Vid testning av ämnen i fast form appliceras en tillräcklig mängd för att säkerställa att hela hudytan täcks av ett jämntjockt skikt. Därefter tillförs avjoniserat vatten (150 µl) på det fasta ämnet, och röret omskakas varsamt. För vissa fasta ämnen kan detta uppnås genom uppvärmning till 30 °C så att testkemikalien smälter eller mjuknar. Alternativt kan ämnet finfördelas till granulat eller pulver.

21. Tre hudbitar ska användas för varje test, och kontrollämnen ska användas i varje studie (experiment). Testkemikalien ska appliceras under 24 timmar vid en temperatur på 20–23 °C. Den tvättas sedan bort med rumstempererat kranvatten tills allt material är avlägsnat.

TER-mätningar

22. Hudens elektriska impedans uttryckt som transkutant elektriskt motstånd (TER) mäts med hjälp av växelström med låg spänning med en Wheatstonebrygga (18). Allmänna tekniska data för bryggan är 1–3 V driftspänning, en sinusformad eller rektangulär växelström på 50–1 000 Hz och ett mätområde på minst 0,1–30 kΩ. Den brygga som användes i valideringsstudien mätte induktans, kapacitans och motstånd upp till värden på 2 000 H, 2 000 μF respektive 2 MΩ vid frekvenser på 100 Hz eller 1 kHz med användning av seriella eller parallella värden. För mätningen av hudkorrosivitet genom TER-bestämning registrerades motståndet vid frekvensen 100 Hz, och seriella värden användes. Före mätning av det elektriska motståndet sänks hudens ytspänning genom tillförsel av etanol (70 %) i tillräcklig mängd för att täcka hudytan. Etanolen får verka några sekunder och hälls sedan ur röret. Därefter hydreras vävnaden genom tillsats av 3 ml $MgSO_4$-lösning (154 mM). För motståndsmätningen (kΩ/hudbit) placeras mätutrustningens elektroder på hudbitens motstående båda ytor (figur 1). Elektrodernas mått och elektrodlängden under krokodilklämman framgår av figur 2. Den inre elektrodklämman hålls uppe på PTFE-röret under motståndsmätningen för att säkerställa att elektrodlängden i magnesiumsulfatlösningen ($MgSO_4$) hålls konstant. Den yttre elektroden placeras innanför receptorkammaren så att elektroden ligger mot kammarens botten. Avståndet mellan fjäderklämman och PTFE-rörets botten ska hållas konstant (figur 2) eftersom avståndet påverkar det erhållna motståndsvärdet. Följaktligen ska avståndet mellan den inre elektroden och hudbiten vara konstant och minimalt (1–2 mm).

23. Om det uppmätta motståndsvärdet överstiger 20 kΩ kan detta bero på att epidermis på hudbiten är täckt av rester av testkemikalien. Man kan försöka att avlägsna denna beläggning genom att täppa till PTFE-röret med tummen (använd handskar) och skaka det i ca 10 sekunder. $MgSO_4$-lösningen kasseras varpå motståndsmätningen upprepas med färsk $MgSO_4$-lösning.

24. Såväl testanordningens egenskaper och mått som försöksförfarandet kan påverka de TER-värden som erhålls. Tröskelvärdet på 5 kΩ för hudkorrosion togs fram utifrån data som erhållits med den specifika anordning och det specifika förfarande som beskrivs för denna metod. Andra tröskelvärden och kontrollvärden kan gälla om testbetingelserna ändras eller om en annan testanordning används. Därför måste metoden och tröskelvärdena för motstånd kalibreras genom tester av ett antal kvalifikationsämnen som väljs bland de ämnen som användes i valideringsstudien (8) (9) eller från liknande kemiska klasser som de kemikalier som undersöks. Ett antal lämpliga kvalifikationsämnen anges i tabell 1.

Metoder som bygger på färgämnesbindning

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

Applicering och avlägsnande av färgämnet sulforhodamin B

26. Efter TER-testet hälls magnesiumsulfatet bort från röret, och huden granskas noga med avseende på synlig skada. Vid avsaknad av tydlig större skada (dvs. perforering) ska 150 μl av en 10 % (w/v) lösning av färgämnet sulforhodiamin B i destillerat vatten (röd syra 52, C.I. 45100, CAS-nummer 3520-42-1) appliceras på varje hudbit i två timmar. Därefter avlägsnas överskott (obundet färgämne) genom tvättning av hudbitarna med kranvattenstråle (upp till rumstemperatur) i ungefär 10 sekunder. Varje hudbit tas försiktigt ut ur PTFE-röret och placeras i en burk (t.ex. en 20-ml scintillationsburk av glas) som innehåller avjoniserat vatten (8 ml). Burkarna

skakas varsamt i fem minuter för att avlägsna eventuella obundna färgrester. Därefter upprepas sköljningen. Hudbitarna tas bort, placeras i burkar som innehåller 5 ml 30-procentigt (vikt i volym) natriumdodecylsulfat (SDS) i destillerat vatten och inkuberas över natten vid 60 °C.

27. Efter inkubationen avlägsnas hudbitarna och slängs, och den kvarvarande lösningen centrifugeras under 8 minuter vid 21 °C (relativ centrifugalkraft ~ 175 × g). Ett 1 ml prov av supernatanten späds ut i volymförhållandet 1:5 (dvs. 1 ml + 4 ml) med 30-procentig (vikt i volym) SDS i destillerat vatten. Lösningens optiska densitet (OD) mäts vid 565 nm.

Beräkning av färgämneshalten

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

Acceptanskriterier

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

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

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

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

Tolkning av resultaten

31. Det erhållna TER-värdet som skiljer frätande testkemikalier från icke frätande fastställdes vid optimeringen av testmetoden, testades under en förvalideringsfas och bekräftades i en formell valideringsstudie.

32. Prediktionsmodellen för TER-metoden för korrosion på råtthud (9) (19) i GHS/CLP-klassificeringssystemet anges nedan:

Testkemikalien anses vara icke frätande för huden

i) om dess genomsnittliga TER-värde överstiger (>) 5 kΩ, eller

ii) om dess genomsnittliga TER-värde är högst (≤) 5 kΩ, och

— hudbitarna inte uppvisar några tydliga skador (dvs. perforering), och

— det genomsnittliga färginnehållet på hudbitarna är mindre än (<) medelhalten av färgämne i den parallella positiva kontroll som behandlats med 10 M HCl (se punkt 30 för positiva värden).

Testkemikalien anses vara korrosiv för huden

i) om dess genomsnittliga TER-värde är högst (≤) 5 kΩ och hudbitarna uppvisar tydliga skador (t.ex. är perforerade), eller

ii) om dess genomsnittliga TER-värde är högst (≤) 5 kΩ, och

— hudbitarna inte uppvisar några tydliga skador (t.ex. perforering), men

— medelhalten av färgämne är större än eller lika hög som (≥) medelhalten av färgämne i den parallella positiva kontroll som behandlats med 10 M HCl (se punkt 30 för positiva kontrollvärden).

33. En enda testomgång med minst tre hudbitsreplikat bör vara tillräcklig för en testkemikalie förutsatt att den resulterande klassificeringen är otvetydig. Om man får resultat som ligger på gränsen, t.ex. icke-konkordanta mätningar av replikaten och/eller genomsnittliga TER-värden motsvarande 5 ± 0,5 kΩ, bör man dock överväga en andra oberoende testomgång (experiment), och även en tredje omgång om resultaten mellan de två första omgångarna (experimenten) är diskordanta.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

34. Motståndsvärden (kΩ) och medelhalter av färgämne (µg/hudbit) ska där det lämpar sig för testkemikalien, liksom för positiva och negativa kontroller, rapporteras i tabellform, inbegripet data för varje enskilt replikat i varje testomgång (experiment) och genomsnittliga värden ± SD. Alla upprepade experiment ska rapporteras. Förekomsten av skador på hudbitarna ska rapporteras för varje testkemikalie.

Testrapport

35. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie och kontrollämnen:

— Monokomponentämne: kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.

— Multikomponentämne, UVCB-ämne och blandning: karakteriseras så långt som möjligt genom beståndsdelarnas kemiska identitet (se ovan), kvantitativa förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Fysikaliskt tillstånd, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Ursprung, satsnummer om sådant finns.

— Eventuell behandling av testkemikalien/kontrollämnet före testning (t.ex. uppvärmning, malning).

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

— Lagringsförhållanden.

Försöksdjur:

— Stam och kön för använda djur.

— Djurens ålder då de användes som donatordjur.

— Ursprung, uppfödningsförhållanden, diet etc.

— Uppgifter om hudberedningen.

Testbetingelser:

— Kalibreringskurvor för testanordningen.

— Kalibreringskurvor för utförande av färgämnesbindning, bandpassen som använts för mätning av OD-värden samt det linjära OD-intervallet för mätningsinstrumenten (dvs. spektrofotometer), i förekommande fall.

— Uppgifter om testförfarandet för TER-mätningar.

— Uppgifter om testförfarandet för bestämning av färgämnesbindning, om detta är tillämpligt.

— De testdoser som använts, exponeringstid och exponeringstemperatur(er).

— Detaljer för tvättningsförfarandet efter exponering.

— Antal hudbitsreplikat som använts per testkemikalie och kontroll (positiva och negativa).

— Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet.

— Hänvisning till historiska uppgifter om modellen. Dessa ska omfatta, men inte vara begränsade till, följande:

i) Uppgifter om huruvida de positiva och negativa TER-kontrollvärdena är godtagbara med avseende på positiva och negativa intervall för kontrollernas motstånd.

ii) Uppgifter om huruvida de positiva och negativa kontrollvärdena för färginnehåll (mätt i µg/hudbit) är godtagbara med avseende på positiva och negativa intervall för kontrollernas färgämneshalt.

iii) Uppgifter om huruvida testresultaten är godtagbara med avseende på historisk variabilitet mellan hudbitsreplikat.

— Beskrivning av beslutskriterierna/den prediktionsmodell som använts.

Resultat:

— Redovisning i tabellform av uppgifterna från TER- och färgbindningstesten (i förekommande fall) för varje enskild testkemikalie och kontroll, för varje testomgång (experiment) och för varje hudbitsreplikat (enskilda prover av djur- och människohud), medelvärden, SD-värden och CV-värden.

— Beskrivning av observerade effekter.

— Härledda klassificeringar med hänvisning till förekommande prediktionsmodell/beslutskriterier.

Diskussion av resultaten

Slutsatser

LITTERATUR

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), andra reviderade utgåvan, FN New York och Genève, 2013. Tillgänglig på: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

(2) Kapitel B.4 i denna bilaga, Akut hudirritation/hudkorrosion.

(3) Kapitel B.40a i denna bilaga, Hudkorrosion in vitro.

(4) Kapitel B.65 i denna bilaga, In vitro-membranbarriärtest för hudkorrosion.

(5) Kapitel B.46 i denna bilaga, Hudirritation in vitro: Testmetod med rekonstruerad human epidermis.

(6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 203, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(7) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. och Balls, M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6 *ATLA* 23, s. 219–255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, s. 471–482.

(9) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. och Liebsch, M (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro* 12, s. 483–524.

(10) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., och Zucco, F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops.*ATLA*23, s. 129–147.

(11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication nr 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, s. 275–280.

(14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication nr 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 218. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., och Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test – Modifications and Validation. Fd. Chem. *Toxicol.*24, s. 507–512.

(17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., och Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro:* Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol. In Vitro* 6,191-194.

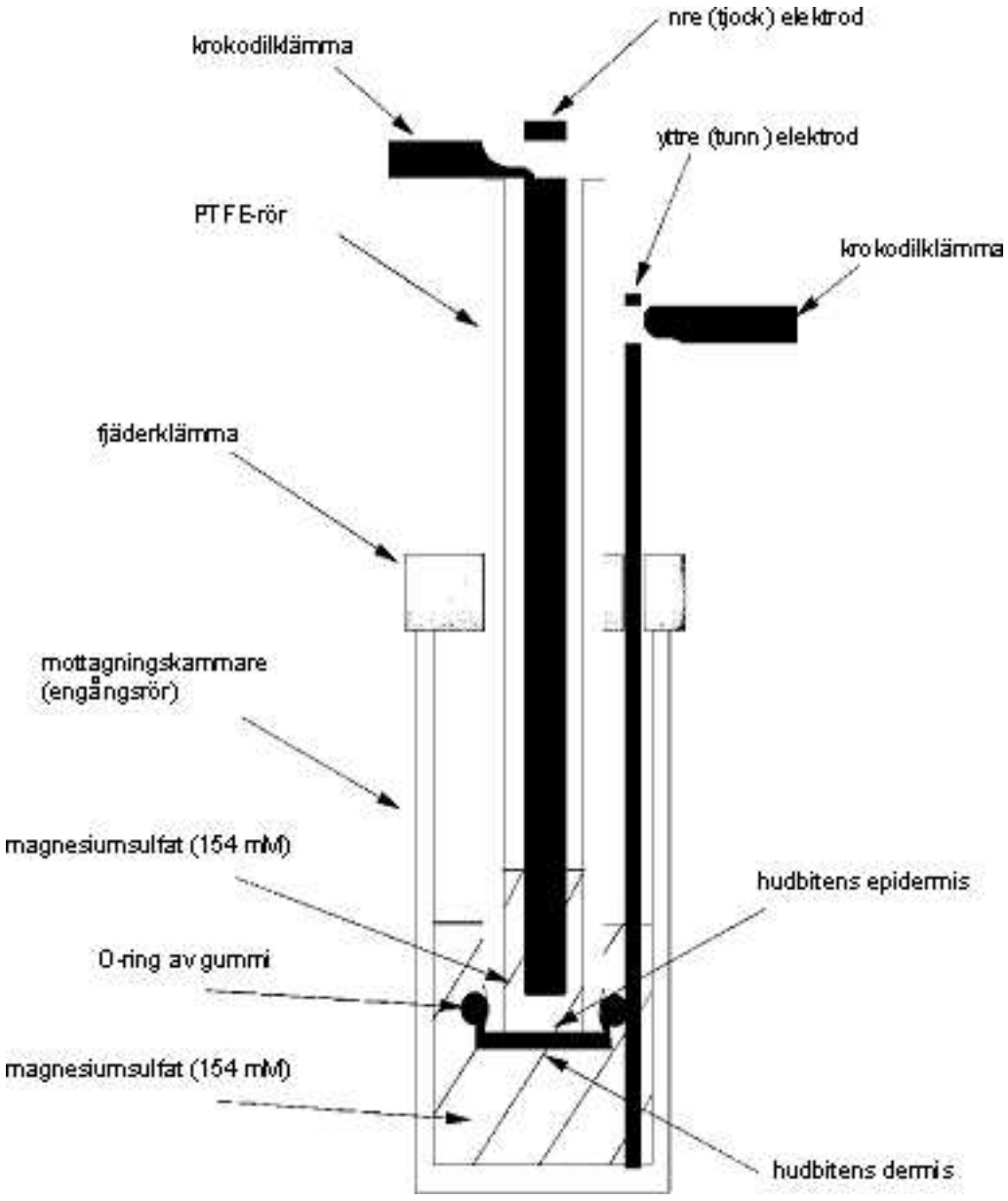
(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. och Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol.Pharmacol.* 62, s. 393–403.

(19) TER SOP (december 2008). *INVITTOX* Protocol (nr 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.

(20) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 34, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

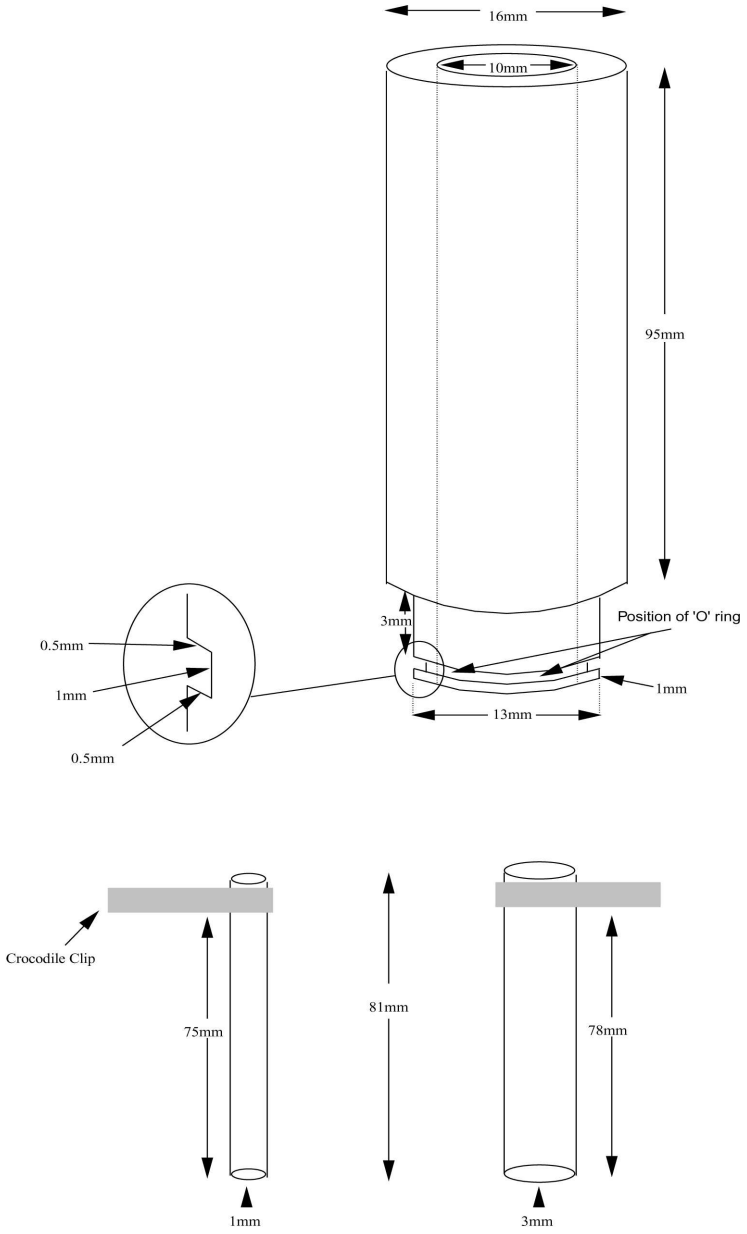
Figur 1

Anordning för ter-analys av Råtthud



Figur 2

Mått på Polytetrafluoretenrör (PTFE-RÖR), MOttagarrör och Elektroder



Kritiska faktorer för den anordning som visas ovan:

— PTFE-rörets innerdiameter.

— Elektrodernas längd jämfört med PTFE-rörets och mottagarrörets. Hudbiten ska inte vara i kontakt med elektroderna, och en standardlängd av elektroden ska vara i kontakt med $MgSO_4$-lösningen.

— Mängden $MgSO_4$-lösning i mottagarröret ska ge ett visst djup i vätskan jämfört med nivån i PTFE-röret, såsom visas i figur 1.

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

Tillägg

DEFINITIONER

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

C: korrosiv.

Kemikalie: Ett ämne eller en blandning.

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

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

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

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

Monokomponentämne: Ett ämne, definierat av sin kvantitativa sammansättning, där 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.

NC: Icke frätande.

OD: Optisk densitet

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 431 (2016). Hudkorrosion innebär att det uppstår en irreversibel skada på huden i form av synlig nekros genom epidermis och in i dermis, efter applicering av en testkemikalie (enligt definitionen i Förenta nationernas globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (1) och Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP-förordningen) ([1])). Denna uppdaterade testmetod B.40a är en in vitro-metod för att identifiera icke frätande och frätande ämnen och blandningar i enlighet med GHS och CLP. Den möjliggör också en partiell underkategorisering av frätande ämnen.

2. Bedömningen av kemikaliers potential för hudkorrosion har i regel inneburit användning av försöksdjur (TM B.4, likvärdig med OECD TG 404, ursprungligen antagen 1981, reviderad 1992, 2002 och 2015) (2). Utöver den nuvarande testmetoden TM B.40a har två andra in vitro-testmetoder för bedömning av kemikaliers potential att orsaka hudkorrosion validerats och antagits: TM B.40 (likvärdig med OECD TG 430) (3) och TM B.65 (likvärdig med OECD TG 435) (4). Dessutom har in vitro-metoden TM B.46 (likvärdig med OECD TG 439) (5) antagits för att testa hudirriterande potential. I OECD:s vägledningsdokument om ett integrerat synsätt på testning och bedömning (IATA) av hudkorrosion och hudirritation beskrivs flera moduler som grupperar olika informationskällor och analysverktyg, och där ges också i) vägledning om hur tillgängliga testdata och icke testdata kan integreras och användas i bedömningen av kemikaliers potential för hudirritation och hudkorrosion och ii) förslag på hur man ska gå till väga när det krävs ytterligare testning (6).

3. Denna testmetod gäller endpointen hudkorrosion hos människa. Den använder sig av rekonstruerad human epidermis (RhE) (framtagen från icke-transformerade epidermala keratinocyter från människa) som histologiskt, morfologiskt, biokemiskt och fysiologiskt nära efterliknar den mänskliga hudens översta del (epidermis). Den motsvarande OECD-testriktlinjen antogs ursprungligen 2004 och uppdaterades dels 2013, för att inkludera ytterligare testmetoder som använder sig av RhE-modeller och möjliggöra användning av metoder som stöder underkategorisering av frätande kemikalier, dels 2015, för att ta med hänvisningar till vägledningsdokumentet om IATA och introducera ett alternativt förfarande för mätning av viabilitet.

4. Denna testmetod omfattar fyra validerade RhE-modeller som finns tillgängliga på marknaden. Förvalideringsstudier (7) följda av en formell valideringsstudie för bedömning av hudkorrosion (8) (9) (10) har genomförts (11) (12) för två av dessa testmodeller som finns tillgängliga på marknaden, nämligen EpiSkin™ Standard Model (SM) och EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (nedan kallade *validerade referensmetoder* (VRM)). Utifrån resultaten av dessa studier rekommenderas användning av de två ovannämnda VRM för lagstadgade ändamål när frätande ämnen (C) ska skiljas från icke frätande ämnen (NC), och EpiSkin™ rekommenderas dessutom som ett stöd vid underkategorisering av frätande ämnen (13) (14) (15). Enligt PS-baserad validering (16) (17) (18) har de två andra in vitro-RhE-testmodellerna för hudkorrosion som finns tillgängliga på marknaden uppvisat liknande resultat som den validerade referensmetoden EpiDerm™. Dessa är SkinEthic™ RHE ([2]) och epiCS® (tidigare kallad EST-1000), och de kan också användas för lagstadgade ändamål i syfte att skilja frätande ämnen från icke frätande (19) (20). Under perioden 2012–2014 har tillverkarna av RhE-modeller genomfört uppföljande valideringsstudier med ett förbättrat protokoll och därmed kunnat korrigera interferens från icke-specifik MTT-reduktion av testkemikalier samt förbättra prestandan både vad gäller särskiljande av C/NC och underkategorisering av frätande ämnen (21) (22). Ytterligare statistiska analyser av data från de uppföljande valideringsstudierna av EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE och epiCS® har genomförts i syfte att identifiera alternativa prediktionsmodeller som förbättrar prediktionskapaciteten för underkategorisering (23).

([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).

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

5. Innan en föreslagen liknande eller modifierad in vitro-RhE-testmetod för hudkorrosion som inte är en VRM kan användas för lagstadgade ändamål bör dess tillförlitlighet, relevans (noggrannhet) och begränsningar för det valda syftet bedömas i syfte att garantera att metoden motsvarar VRM, i enlighet med kraven i prestandastandarderna (PS) (24) som fastställts i enlighet med principerna i OECD:s vägledningsdokument nr 34 (25). Ömsesidig dataacceptans kan endast garanteras efter att eventuella föreslagna testmetoder, nya eller uppdaterade, som följer PS har granskats och inkluderats i motsvarande testriktlinjer. De testmodeller som inkluderas i testriktlinjerna kan användas i enskilda länder för att möta ländernas krav på testresultat gällande in vitro-testmetoder för hudkorrosion, tack vare den ömsesidiga dataacceptansen.

DEFINITIONER

6. Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

7. Den här testmetoden möjliggör identifiering av frätande och icke frätande ämnen och blandningar i enlighet med GHS och CLP. Den stöder dessutom indelning av frätande ämnen och blandningar i en valfri underkategori 1A, i enlighet med GHS (1), liksom i en kombination av underkategorierna 1B och 1C (21) (22) (23). En begränsning med den här testmetoden är att den inte särskiljer mellan underkategori 1B respektive 1C för hudkorrosion enligt GHS och CLP på grund av sin begränsade uppsättning av välkända kemikalier för in vivo-underkategori 1C för korrosiva ämnen. Testmodellerna EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE och epiCS® kan användas för underkategorisering (dvs. mellan 1A och 1B respektive 1C och NC).

8. En stor mängd kemikalier, främst enskilda ämnen, har testats för att validera de testmodeller som ingår i den här testmetoden gällande identifiering av icke- korrosiva och korrosiva ämnen. I den empiriska databasen från valideringsstudien ingår 60 kemikalier från flera olika kemiska klasser (8) (9) (10). Utvecklarna av testmetoden har genomfört test för att visa underkategoriseringens sensitivitet, specificitet, noggrannhet och reproducerbarhet inom laboratoriet, och resultaten från dessa test har granskats av OECD (21) (22) (23). Utifrån de samlade data som finns tillgängliga är testmetoden tillämplig på en mängd olika kemiska klasser och fysikaliska tillstånd, inklusive vätskor, halvfasta ämnen, fasta ämnen och vaxer. Vätskorna kan vara vattenbaserade eller inte. fasta ämnen kan vara lösliga eller olösliga i vatten. När det är möjligt bör ämnen i fast form pulveriseras före applicering, och ingen annan beredning behövs. Om det finns bevis för att en testmodell som ingår i den här testmetoden inte är tillämplig på en specifik kategori av testkemikalier bör den inte användas för denna kategori. Eftersom denna testmetod är tillämplig på ämnen anses den även kunna användas för blandningar. Med tanke på att blandningar omfattar en stor mängd kategorier och sammansättningar och det i nuläget endast finns begränsad information om testning av blandningar bör dock testmetoden inte användas på blandningskategorier för vilka den har visat sig vara icke-applicerbar (dvs. enligt den strategi som föreslås i (26)) ska testmetoden då inte användas för denna specifika kategori av blandningar. Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag. Gaser och aerosoler har ännu inte bedömts genom valideringsstudier (8) (9) (10). Det är tänkbart att de kan testas med RhE-teknik, men den aktuella testmetoden ger inte möjlighet att testa gaser och aerosoler.

9. Testkemikalier som absorberar ljus i samma våglängdsområde som MTT-formazan och testkemikalier som direkt kan reducera vitalfärgämnet MTT (till MTT-formazan) kan störa mätningarna av vävnadens viabilitet och göra det nödvändigt att använda anpassade kontroller för korrigeringar. Vilken typ av anpassade kontroller som krävs beror på vilken typ av interferens som skapas av testkemikalien samt vilken procedur som används för att mäta MTT-formazan (se punkterna 25–31).

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

TESTPRINCIP

11. Testkemikalien appliceras lokalt på en tredimensionell RhE-modell bestående av icke-transformerade epidermala keratinocyter från människa, vilka har odlats till att bilda en flerskiktad och starkt differentierad modell av human epidermis. Den består av ordnade skikt i form av basallager, taggcellslager och granulärt lager samt ett flerskiktat hornlager innehållande intercellulära lamellära lipidlager av de huvudsakliga lipidklasser som motsvarar dem som förekommer in vivo.

12. Principen för bestämningen följer hypotesen om att kemikalier är korrosiva om de kan penetrera hornlagret genom diffusion eller erosion och är tillräckligt cytotoxiska för att orsaka celldöd i underliggande cellskikt. Cellviabiliteten mäts genom enzymatisk omvandling av vitalfärgämnet MTT [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid, tiazolylblått-tetrazoliumbromid, CAS-nummer 298-93-1], till ett blått formazansalt som mäts kvantitativt efter att det har extraherats från vävnaderna (27). Irriterande kemikalier identifieras genom deras förmåga att minska cellviabiliteten under definierade gränsvärden (se punkterna 35 och 36). Den RhE-baserade testmetoden för hudkorrosion har visat sig vara prediktiv för in vivo-effekter på kaninhud, enligt TM B.4 (2).

DEMONSTRATION AV KOMPETENS

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

Tabell 1

Lista på kvalifikationsämnen ([1])

Ämne	CAS-nr	Kemisk klass ([2])	GHS/CLP-kategori baserat på in vivo-resultat ([3])	VRM Kat. baserat på In vitro-resultat ([4])	MTT Reducerare ([5])	Fysiskt tillstånd
Underkategori 1A frätande ämnen in vivo						
Bromättiksyra	79-08-3	Organisk syra	1A	(3) 1A	—	S
Bortrifluoriddihydrat	13319-75-0	Oorganisk syra	1A	(3) 1A	—	L
Fenol	108-95-2	Fenol	1A	(3) 1A	—	S
Dikloroacetylklorid	79-36-7	Elektrofil	1A	(3) 1A	—	L
Kombination av underkategorierna 1B och 1C för frätande ämnen in vivo						
Monohydratisk glyoxylsyra	563-96-2	Organisk syra	1B och 1C	(3) 1B och 1C	—	S

Ämne	CAS-nr	Kemisk klass ([2])	GHS/CLP-kategori baserat på in vivo-resultat ([3])	VRM Kat. baserat på In vitro-resultat ([4])	MTT Reducerare ([5])	Fysiskt tillstånd
Underkategori 1A frätande ämnen in vivo						
Mjölksyra	598-82-3	Organisk syra	1B och 1C	(3) 1B och 1C	—	L
Etanolamin	141-43-5	Organisk bas	1B	(3) 1B och 1C	Y	Trögflytande ämnen
Saltsyra (14,4 %)	7647-01-0	Oorganisk syra	1B och 1C	(3) 1B och 1C	—	L
Icke frätande ämnen in vivo						
Fenetylbromid	103-63-9	Elektrofil	NC	(3) NC	Y	L
4-amino-1,2,4-triazol	584-13-4	Organisk bas	NC	(3) NC	—	S
4-(metyltio)-bensaldehyd	3446-89-7	Elektrofil	NC	(3) NC	Y	L
Laurinsyra	143-07-7	Organisk syra	NC	(3) NC	—	S

Förkortningar: CAS-nr = Chemical Abstracts Service Registry Number VRM = validerad referensmetod NC = icke frätande, Y = ja, S = fast form, L = flytande form

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

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

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

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

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

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

FÖRFARANDE

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

RHE-TESTMETOD, KOMPONENTER

Allmänna betingelser

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

Funktionella betingelser

Viabilitet

17. För kvantifiering av vävnadens viabilitet används MTT-testet (27). De viabla cellerna i den konstruerade RhE-vävnaden reducerar vitalfärgämnet MTT till en fällning av blått MTT-formazan, som därefter extraheras från vävnaden med hjälp av isopropanol (eller ett liknande lösningsmedel). Extraktionsmedlets optiska densitet (OD) bör vara tillräcklig låg, dvs. < 0,1. Det extraherade MTT-formazanet kan kvantifieras antingen med hjälp av en mätning av standardabsorbans (OD) eller med HPLC/UPLC-spektrofotometri (38). Användare av RhE-modellen bör se till att varje sats som används uppfyller de definierade kriterierna för den negativa kontrollen. Utvecklaren/leverantören av RhE-modellen bör fastställa acceptabla gränsvärden (övre och nedre gräns) för den negativa kontrollens OD-värden. I tabell 2 anges de acceptabla gränsvärdena för de negativa OD-kontrollvärdena som gäller för de fyra validerade RhE-testmodeller som ingår i denna testmetod. Vid användning av en HPLC/UPLC-spektrofotometer ska de negativa OD-kontrollvärden som anges i tabell 2 användas som acceptanskriterier för den negativa kontrollen. Det bör finnas dokumenterat att de vävnader som behandlas med den negativa kontrollen är stabila i odlingar (ger motsvarande resultat vid viabilitetsmätning) under testets hela exponeringsperiod.

Tabell 2

Godkända OD-värden för den negativa kontrollen av satsens kvalitet

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

Barriärfunktion

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

Morfologi

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

Reproducerbarhet

20. Metodanvändarna ska kunna säkerställa och påvisa testmetodens reproducerbarhet över tid, genom positiva och negativa kontroller. Testmetoden bör endast användas om utvecklaren/leverantören av RhE-modellen tillhandahåller data som visar att modellen kan reproduceras över tid med frätande och icke frätande kemikalier från t.ex. listan med kvalifikationsämnen (tabell 1). Vid användning av en testmetod för underkategorisering bör även reproducerbarheten för underkategoriseringen demonstreras.

Kvalitetskontroll

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

Tabell 3

Kvalitetskriterier för godkännande

	Nedre gräns för godkännande	Acceptansintervallets övre gräns
EpiSkin™ (SM) (18	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (34)	ET50 = 4,0 timmar	ET50 = 8,7 timmar
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET50 = 4,0 timmar	ET50 = 10,0 timmar
epiCS®	ET50 = 2,0 timmar	ET50 = 7,0 timmar
(1 % Triton X-100) (36)		

Applicering av testkemikalien och kontrollämnen

22. Minst två vävnadsreplikat ska användas per testkemikalie och för kontrollerna i varje omgång. För vätskor och fasta ämnen appliceras en tillräcklig mängd av testkemikalien så att hudens yta täcks med ett jämnt lager så att en infinit dos undviks. Dosen ska vara minst 70 µl/cm^2 eller 30 mg/cm^2. För fasta ämnen fuktas hudens yta med

avjoniserat eller destillerat vatten före appliceringen för att förbättra kontakten mellan testkemikalien och hudens yta (34) (35) (36) (37). När det är möjligt ska fasta ämnen testas i form av ett fint pulver. Appliceringsmetoden måste vara lämplig för testkemikalien (se hänvisningarna 34–37). Vid slutet av exponeringsperioden tvättas testkemikalien omsorgsfullt bort från hudens yta med buffrad vattenlösning eller 0,9-procentig NaCl. Beroende på vilken av de fyra validerade RhE-modellerna som används ska två eller tre exponeringsperioder användas per testkemikalie (för alla godkända RhE-modeller): 3 min och 1 timme, men för EpiSkin™ en ytterligare exponeringstid på 4 timmar). Inkubationstiden under exponeringen kan variera mellan rumstemperatur och 37 °C beroende på typ av RhE-testmodell och exponeringsperiod.

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

Mätning av cellernas viabilitet

24. MTT-metoden är en validerad kvantitativ metod som ska användas i denna testmetod för att mäta cellviabiliteten (27). Vävnadsprovet placeras i en MTT-lösning av lämplig koncentration (0,3 eller 1 mg/ml) i 3 timmar. Fällningen i form av blått formazan extraheras sedan från vävnaden med ett lösningsmedel (t.ex. isopropanol, sur isopropanol), och koncentrationen av formazan mäts genom bestämning av OD vid 570 nm med ett filterbandpass på högst ± 30 nm, eller med hjälp av en HPLC/UPLC-spektrofotometer (se punkterna 30 och 31) (38).

25. Testkemikalierna kan störa MTT-testet, antingen genom direkt reduktion av MTT till blått formazan och/eller genom färginterferens om testkemikalien absorberar ljus, i sitt ursprungliga tillstånd eller till följd av behandlingar, i samma OD-intervall som formazan (570 ± 30 nm, främst blå och lila kemikalier). I syfte att upptäcka och korrigera potentiell interferens från dessa testkemikalier bör ytterligare kontroller, som en icke-specifik MTT-reduktionskontroll (NSMTT) och en icke-specifik färgkontroll (NSC) användas (se punkterna 26–30). Detta är särskilt viktigt när en specifik testkemikalie inte kan tvättas bort helt och hållet från vävnaden eller när den har penetrerat huden och därför påvisas i vävnaden vid genomförande av MTT-viabilitetstestet. En detaljerad beskrivning av hur direkt MTT-reduktion och färgämnesinterferens kan korrigeras finns i SOP för de tre validerade testmodellerna (34) (35) (36) (37).

26. För att identifiera vilka av testkemikalierna som reducerar MTT bör de tillsättas en och en till ett nypreparerat MTT-medium (34) (35) (36) (37). Om MTT-blandningen som innehåller testkemikalien färgas blå/lila kan testkemikalien antas reducera MTT direkt, och då bör en ytterligare funktionskontroll utföras på icke-viabel epidermis, oberoende av om en mätning av standardabsorbans (OD) eller en HPLC/UPLC-spektrofotometerprocedur har använts. I nämnda funktionskontroll ska död vävnad användas som endast har residual metabolisk aktivitet men som kan absorbera testkemikalien i samma mängd som viabel vävnad kan. Varje testkemikalie som kan reducera MTT ska appliceras på minst två döda vävnadsreplikat per exponeringstid, och dessa ska genomgå hela hudkorrosionstestet. Därefter beräknas vävnadens faktiska viabilitet utifrån procentandelen viabel vävnad som har exponerats för en MTT-reducerare minus procentandelen icke-specifik MTT-reduktion som erhålls från den döda vävnad som har exponerats för samma MTT-reducerare, och detta beräknas genom en jämförelse med den negativa kontroll som gjorts parallellt för det test som korrigeras (%NSMTT).

27. För att identifiera potentiell interferens av färgade testkemikalier eller av testkemikalier som färgas vid kontakt med vatten eller isopropanol och för att kunna avgöra om ytterligare kontroller behövs bör en spektral analys av testkemikalien utföras i vatten (miljö under exponering) och/eller i isopropanol (extraherande lösningsmedel).

Om testkemikalien i vatten och/eller isopropanol absorberar ljus inom ett intervall på 570 ± 30 nm bör ytterligare färgningskontroller utföras, och om sådana kontroller inte behövs bör en HPLC/UPLC-spektrofotometerprocedur användas (se punkterna 30 och 31). Vid mätning av standardabsorbans (OD) ska varje färgad interfererande testkemikalie appliceras på minst två viabla vävnadsreplikat per exponering, och dessa ska genomgå hela hudkorrosionstestet men inkuberas med medium i stället för MTT-lösning under MTT-inkuberingsfasen för att generera en icke-specifik färgkontroll (NSC_{living}). NSC_{living} måste utföras samtidigt för varje färgad testkemikalie per exponering (i varje omgång) på grund av den levande vävnadens inneboende biologiska mångfald. Därefter beräknas vävnadens faktiska viabilitet efter procentandelen levande vävnad som erhålls efter det att den levande vävnaden har exponerats för en interfererande testkemikalie och inkuberats med en MTT-lösning minus procentandelen icke-specifik färg som erhålls från levande vävnad som har exponerats för den interfererande testkemikalien och inkuberats i ett medium utan MTT, parallellt med det test som korrigeras ($\%NSC_{living}$).

28. Testkemikalier som konstaterats orsaka både direkt MTT-reduktion (se punkt 26) och färginterferens (se punkt 27) kräver en tredje typ av kontroller utöver de NSMTT- och NSC_{living}-kontroller som beskrivs ovan, vid mätningen av standardabsorbans (OD). Detta är vanligtvis fallet med mörkt färgade testkemikalier som interfererar med MTT-testet (t.ex. blå, lila, svart) eftersom deras naturliga färg gör det omöjligt att bedöma om de reducerar MTT direkt så som beskrivs i punkt 26. Dessa testkemikalier kan bindas till både levande och död vävnad, och en NSMTT-kontroll kan då utöver att korrigera den potentiella direkta MTT-reduktionen även korrigera den färginterferens som uppstår när testkemikalien binds till död vävnad. Detta kan leda till en dubbel korrigering av färginterferens eftersom NSC_{living} redan korrigerar färginterferens som uppstår när testkemikalien binds till levande vävnad. För att undvika dubbel korrigering av färginterferens krävs en tredje kontroll anpassad för icke-specifik färg i död vävnad (NSC_{killed}). Vid nämnda kontroll appliceras testkemikalien på minst två döda vävnadsreplikat vilka sedan genomgår hela testproceduren men inkuberas i ett medium i stället för i en MTT-lösning under MTT-inkubationsfasen. Det räcker med en enda NSC_{killed}-kontroll per testkemikalie oavsett antalet oberoende tester/omgångar som har utförts, men kontrollen bör genomföras parallellt med NSMTT-kontrollen och, om det är möjligt, med samma sats av vävnadsprover. Därefter beräknas vävnadens faktiska viabilitet efter procentandelen levande vävnad som erhålls efter det att den levande vävnaden har exponerats för en interfererande testkemikalie och inkuberats med en MTT-lösning minus %NSMTT minus $\%NSC_{living}$ plus procentandelen icke-specifik färg som erhålls från levande vävnad som har exponerats för den interfererande testkemikalien och inkuberats i ett medium utan MTT, beräknat efter den negativa kontroll som utförts parallellt med det test som korrigeras ($\%NSC_{killed}$).

29. Observera att icke-specifik MTT-reduktion och icke-specifik färginterferens kan öka avläsningen av vävnadsprovet så att det överskrider spektrofotometerns linjeintervall. Laboratoriet ska därför fastställa spektrofotometerns linjära område med MTT-formazan (CAS-nr 57360-69-7) från en kommersiell källa innan försök med testkemikalier för lagstadgade ändamål inleds. Mätningen av standardabsorbans (OD) med hjälp av spektrofotometer är lämplig för bedömning av vilka kemikalier som direkt reducerar eller orsakar färginterferens i de fall testkemikalien, utan att ha korrigerats för direkt MTT-reduktion och/eller färginterferens, ger OD-värden som ligger inom spektrofotometerns linjeintervall eller då redan den icke-korrigerade procentuella viabilitet som erhålls med testkemikalien räcker för att definiera denna som frätande (se punkterna 35 och 36). Dock ska resultat utifrån negativa kontroller där testkemikalierna har producerat %NSMTT och/eller $\%NSC_{living}$ som är högre än 50 % beaktas med försiktighet.

30. För färgade testkemikalier som inte är kompatibla med mätningen av standardabsorbans (OD) på grund av alltför stark interferens vid MTT-testet kan en alternativ HPLC/UPLC-spektrofotometerprocedur användas för att mäta MTT-formazan (se punkt 31) (37). HPLC/UPLC-spektrofotometersystemet gör det möjligt att separera MTT-formazanet från testkemikalien före kvantifiering (38). Därför behövs aldrig NSC_{living}- eller NSC_{killed}-kontroller vid användning av HPLC/UPLC-spektrofotometerteknik oavsett vilken kemikalie som testas. NSMTT-kontroller ska dock användas när det finns misstankar om att testkemikalien reducerar MTT direkt eller när den har en färg som gör det omöjligt att bedöma huruvida den kan reducera MTT direkt (enligt beskrivningen i punkt 26). Vid

användning av HPLC/UPLC-spektrofotometri för att mäta MTT-formazan beräknas vävnadens viabilitet som förhållandet (i procent) mellan å ena sidan den topparea för MTT-formazan som erhållits med levande vävnad exponerad för testkemikalien och, å andra sidan, den topparea för MTT-formazan som erhållits med den parallellt utförda negativa kontrollen. För testkemikalier som kan reducera MTT direkt beräknas vävnadens viabilitet genom den levande vävnadens viabilitet i procent minus %NSMTT. Slutligen bör nämnas att kemikalier som direkt reducerar MTT även kan orsaka färginterferens, vilken stannar kvar i vävnaden efter behandling och reducerar MTT så starkt att de orsakar OD-värden (påvisbart genom OD-standardmätning) eller toppareor (påvisbart genom användning av en UPLC/HPLC- spektrofotometer) på de testade vävnadsextrakt som faller utom spektrofotometerns linjeintervall och därför inte kan bedömas. Detta är dock väldigt ovanligt.

31. HPLC/UPLC-spektrofotometersystem kan användas för att mäta MTT-formazan för alla typer av testkemikalier (färgade, icke-färgade, de som reducerar MTT och de som inte gör det) (38). På grund av mångfalden av HPLC/UPLC-spektrofotometersystem ska HPLC/UPLC-spektrofotometersystemets godtagbarhet demonstreras innan det används för att kvantifiera MTT-formazan från vävnadsextrakt, genom att systemet uppfyller acceptanskriterierna för en uppsättning standardkvalifikationsparametrar som baseras på dem som beskrivs i FDA:s vägledning för industrin om bioanalytisk metodvalidering (38) (39). Dessa nyckelparametrar och deras acceptanskriterier anges i tillägg 4. När de acceptanskriterier som anges i tillägg 4 är uppfyllda ska HPLC/UPLC-spektrofotometersystemet anses vara godkänt och färdigt att användas för mätning av MTT-formazan under de testbetingelser som beskrivs i denna testmetod.

Acceptanskriterier

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

Tolkning av resultaten och prediktionsmodell

33. De OD-värden som erhålls för varje testkemikalie används för att beräkna procentuell viabilitet i förhållande till den negativa kontrollen, som sätts till 100 %. Vid användning av HPLC/UPLC-spektrofotometri beräknas vävnadens viabilitet som förhållandet (i procent) mellan å ena sidan den topparea för MTT-formazan som erhållits med levande vävnad exponerad för testkemikalien och, å andra sidan, den topparea för MTT-formazan som erhållits med den parallellt utförda negativa kontrollen. De avreglerade procentvärdena för cellviabilitet som skiljer korrosiva testkemikalier från icke-korrosiva (eller som skiljer olika korrosiva underkategorier från varandra) definieras nedan i punkterna 35 och 36, separat för varje testmodell som ingår i denna testmetod, och ska användas vid tolkning av resultaten.

34. En enda testomgång med minst tre vävnadsreplikat bör vara tillräcklig för en testkemikalie förutsatt att den resulterande klassificeringen är otvetydig. Om man får resultat som ligger på gränsen, t.ex. icke-konkordanta replikatmätningar, bör man dock överväga en andra testomgång, och även en tredje omgång om resultaten mellan de två första omgångarna är diskordanta.

35. Prediktionsmodellen för EpiSkin™-testmodellen för hudkorrosion (9) (34) (22), utifrån klassificeringssystemet för GHS/CLP, anges i tabell 4:

Tabell 4

EpiSkin™ prediktionsmodell

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

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

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

Tabell 5

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE och epiCS®

Viabilitet mätt i exponeringstidspoäng (t = 3 och 60 minuter)	Prediktion att beakta
STEG 1 för EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE och epiCS®	
< 50 % efter 3 minuters exponering	**Frätande**
≥ 50 % efter 3 minuters exponering **OCH** < 15 % efter 60 minuters exponering	**Frätande**
≥ 50 % efter 3 minuters exponering **OCH** ≥ 15 % efter 60 minuters exponering	**Icke frätande**
STEG 2 för EpiDerm™ SCT – för ämnen/blandningar som har identifierats som frätande i steg 1	
< 25 % efter 3 minuters exponering	Valfri underkategori 1A *

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

DATA OCH RAPPORTERING

Data

37. För varje omgång ska data från enskilda vävnadsreplikat (t.ex. OD-värden och data om beräknad procentuell cellviabilitet för varje testkemikalie, inklusive klassificering) rapporteras i tabellform, i tillämpliga fall även data från upprepade försök. Utöver detta ska medelvärden, viabilitetsintervall och variationskoefficienterna mellan vävnadsreplikaten redovisas för varje test. Observerade interaktioner med MTT-reagenset av ämnen som direkt reducerar MTT eller av färgade testkemikalier ska rapporteras för varje testad kemikalie.

Testrapport

38. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie och kontrollkemikalier:

— Monokomponentämne: kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.

— Multikomponentämne, UVCB-ämne och blandning: karakteriseras så långt som möjligt genom beståndsdelarnas kemiska identitet (se ovan), kvantitativa förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Fysikaliskt tillstånd, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Ursprung, satsnummer om sådant finns.

— Eventuell behandling av testkemikalien/kontrollämnet före testning (t.ex. uppvärmning, malning).

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

— Lagringsförhållanden.

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

Testbetingelser:

— RhE-modell (inklusive satsnummer).

— Kalibreringsinformation för mätningsinstrument (t.ex. spektrofotometer), våglängd och filterbandpass (i förekommande fall) som har använts för kvantifiering av MTT-formazan, samt mätinstrumentets linjeintervall.

— Beskrivning av den metod som har använts för att kvantifiera MTT-formazan.

— Beskrivning av kvalitetsbestämningen av HPLC/UPLC-spektrofotometersystemet (i förekommande fall).

— Fullständig stödjande information för den specifika RhE-modell som använts, inklusive modellens prestanda. Dessa ska omfatta, men inte vara begränsade till, följande:

i) Viabilitet.

ii) Barriärfunktion.

iii) Morfologi.

iv) Reproducerbarhet och prediktionskapacitet.

v) Kvalitetskontroller av modellen.

— Hänvisning till historiska uppgifter om modellen. I denna hänvisning ska bland annat framgå huruvida kvalitetskontrolldata är godtagbara med avseende på historiska data om respektive sats.

— Demonstrationen av kompetens för utförande av testmetoden ska göras före rutinanvändning, genom testning av kvalifikationsämnen.

Provningsförfarande:

— Detaljerad beskrivning av testet (inklusive tvättning efter exponering).

— Doserna för den testkemikalie och de kontrollkemikalier som använts.

— Exponeringstid och exponeringstemperatur(er).

— Uppgifter om kontroller som använts för direkt MTT-reduktion och/eller färgade testkemikalier, i förekommande fall.

— Antal vävnadsreplikat som använts per testkemikalie och kontroll (PC, negativa kontroller och NSMTT, NSC_{living} och NSC_{killed}, i förekommande fall), per exponeringstid.

— Beskrivning av beslutskriterierna/den prediktionsmodell som använts beroende på RhE-modell.

— Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet (inklusive tvättningsförfarandet).

Acceptanskriterier för testet och omgången:

— Medelvärden och godtagbara intervall för parallella positiva och negativa kontroller på grundval av historiska data.

— Acceptabel variabilitet mellan vävnadsreplikaten för negativa och positiva kontroller.

— Acceptabel variabilitet mellan vävnadsreplikaten som behandlats med testkemikalien.

Resultat:

— Redovisning i tabellform av individuella testkemikalier och kontroller, för varje exponeringsperiod, testomgång och replikatmätning inklusive OD-värden eller toppareor för MTT-formazan, vävnadsviabilitet i procent, vävnadens medelviabilitet i procent, skillnader mellan replikaten samt i förekommande fall standardavvikelser och/eller variationskoefficienter.

— I förekommande fall även resultaten från de kontroller som använts för ämnen som direkt reducerar och/eller för färgande testkemikalier, inklusive OD-värden eller toppareor för MTT-formazan, %NSMTT, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, skillnader mellan vävnadsreplikat, standardavvikelser och/eller variationskoefficienter (i förekommande fall) samt den slutliga korrekta vävnadsviabiliteten i procent.

— Resultaten för testkemikalier och kontrollkemikalier utifrån definierade acceptanskriterier för omgången och testet.

— Beskrivning av övriga observerade effekter.

— Härledda klassificeringar med hänvisning till prediktionsmodell och/eller beslutskriterier.

Diskussion av resultaten

Slutsatser

LITTERATUR

(1) FN (2013). FN:s globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS). Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva. Tillgänglig på: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) Kapitel B.4 i denna bilaga, Akut hudirritation/hudkorrosion.

(3) Kapitel B.40 i denna bilaga, Hudkorrosion in vitro.

(4) Kapitel B.65 i denna bilaga, In vitro-membranbarriärtest för hudkorrosion.

(5) Kapitel B.46 i denna bilaga, Hudirritation in vitro: Testmetod med rekonstruerad human epidermis.

(6) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/ Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 203, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(7) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. och Balls, M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 *ATLA* 23:219–255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol. in vitro* 12, s. 471–482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. och Liebsch, M (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for SkinCorrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicol. in vitro 12, s. 483–524.

(10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. och Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: s. 371-401.

(11) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., och Zucco, F. (1995). Praktiska aspekter på validering av testmetoder för toxicitet. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23, s. 129–147.

(12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological TestMethods. NIH Publication nr 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM:s bedömning av EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM) och TER-testet för transkutant elektriskt motstånd i råtthud: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication nr 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA

(14) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), utfärdad av ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), den 3 april 1998.

(15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, utfärdad av ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 mars 2000.

(16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. och Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol. in vitro* 19: s. 925-929.

(17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann, H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., och Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol. in vitro* 20 s. 547-559.

(18) Tornier C., Roquet M. och Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 cm^2 Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: s. 1379-1385.

(19) EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, utfärdad av ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), den 17 november 2006.

(20) EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, utfärdad av ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), den 12 juni 2009.

(21) OECD (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment nr.190. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(22) Alépée N., Grandidier M.H., och Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision av OECD:s vägledningsdokument 431. *Toxicol. In Vitro* 28:131-145.

(23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., och Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055-2080.

(24) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris

(25) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 34, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(26) Eskes C. m.fl. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62:393-403.

(27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Metoder* 65, s. 55–63.

(28) Tinois E., m.fl. (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro*. I: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier A.,. Goldberg A.M och Maibach H.I. (Eds): s. 133-140.

(29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. och Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. Toxicol. in vitro 8, s. 889–891.

(30) Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J och Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. Inter. J. Pharmaceu. 203, s. 211–225.

(31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. och Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post-Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193, s. 310–319.

(32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS och Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9, s. 163–171.

(33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF och Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8, s. 747–756.

(34) EpiSkin™ SOP (december 2011). *INVITTOX* protokoll nr 118. EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.

(35) EpiDerm™ SOP (februari 2012). Version MK-24-007-0024 protokoll för: *In Vitro* EpiDerm™-testet för hudkorrosion (EPI-200-SCT), för användning med MatTek Corporations modell för rekonstruerad human epidermis EpiDerm.

(36) SkinEthic™ RHE SOP (januari 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.

(37) EpiCS® SOP (januari 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.

(38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., och McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: s. 741-761.

(39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (maj 2001). Tillgänglig på: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

Tillägg 1

DEFINITIONER

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

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

Kemikalie: Ett ämne eller en blandning.

Konkordans: ett mått på testmetodens prestanda för sådana testmetoder som ger kategoriska resultat, och en aspekt av relevans. Termen används omväxlande med noggrannhet och definieras som andelen av alla testade kemikalier som klassificeras korrekt som positiva eller negativa (9). Konkordansen är direkt beroende av förekomsten av positiva värden i den testkemikalie som undersöks (25).

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

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

HPLC: Högupplösande vätskekromatografi.

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

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

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

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

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

Multikomponentämne: ett ämne, definierat av sin kvantitativa sammansättning, där mer än en huvudsaklig beståndsdel förekommer i en koncentration på > 10 och < 80 viktprocent. Ett multikomponentämne är resultatet av en tillverkningsprocess. Skillnaden mellan blandningar och 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.

NC: Icke frätande.

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

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

NSMTT: Icke-specifik MTT-reduktion (Non-Specific MTT).

OD: optisk densitet.

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

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

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

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

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

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

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

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

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 denna testmetod.

UPLC: Ultra-högupplösande vätskekromatografi.

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

Tillägg 2

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

Testmodellernas komponenter	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Modellyta	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Antal vävnadsreplikat	Minst 2 per exponering	2–3 per exponering	Minst 2 per exponering	Minst 2 per exponering
Behandlingsdoser och applicering	Vätskor och trögflytande ämnen: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm^2) Fasta ämnen: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ± 5µl NaCl solution (9 g/l) Vaxaktiga/klibbiga ämnen: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) med nylonnät	Vätskor: 50 µl (79,4 µl/cm^2) med eller utan nylonnät *Förtest för att se om testkemikalien är kompatibel med nylonnätet* Halvfasta ämnen: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Fasta ämnen: 25 µl H_2O (eller mer om det krävs) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Vaxer: Platt ”skivformad” bit på ca 8 mm i diameter som placeras ovanpå vävnaden och väts med 15 µl H_2O.	Vätskor och trögflytande ämnen: 40 µl ± 3µl (80 µl/cm^2) med nylonnät *Förtest för att se om testkemikalien är kompatibel med nylonnätet* Fasta ämnen: 20 µl ± 2µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Vaxaktiga/klibbiga ämnen: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) med nylonnät	Vätskor: 50 µl ± cm2 (83,3 µl/cm^2) med nylonnät *Förtest för att se om testkemikalien är kompatibel med nylonnätet* Halvfasta ämnen: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Fasta ämnen: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (eller mer om det krävs) Vaxaktiga ämnen: Platt “kaka” bit på ca 8 mm i diameter som placeras ovanpå vävnaden och väts med 15 µl H_2O.

Testmodellernas komponenter	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Förberedande test av direkt MTT-reduktion	50 µl (vätskor) eller 20 mg (fasta ämnen)+ 2 ml MTT 0,3 mg/ml lösning för 180 ± 5 min vid 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → om lösningen färgas blå/lila ska anpassade water killed-kontroller genomföras	50 µl (vätskor) eller 25 mg (fasta ämnen) + 1 ml MTT 1 mg/ml lösning för 60 min vid 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → om lösningen färgas blå/lila ska anpassade freeze killed-kontroller genomföras	40 µl (vätskor) eller 20 mg (fasta ämnen)+ 1 ml MTT 1 mg/ml solution för 180 ± 15 min vid 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → om lösningen färgas blå/lila ska anpassade freeze killed-kontroller genomföras	50 µl (vätskor) eller 25 mg (fasta ämnen)+ 1 ml MTT 1 mg/ml lösning för 60 min vid 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → om lösningen färgas blå/lila ska anpassade freeze killed-kontroller genomföras
Förberedande test av eventuell färginterferens	10 µl (vätskor) eller 10 mg (fasta ämnen) + 90 µl H_2O som blandas i 15 min vid rumstemperatur → om lösningen färgas ska anpassade kontroller genomföras	50 µl (vätskor) eller 25 mg (fasta ämnen) + 300 µl H_2O i 60 min vid 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → om lösningen färgas ska anpassade living-kontroller genomföras	40 µl (vätskor) eller 20 mg (fasta ämnen) + 300 µl H_2O som blandas i 60 min vid rumstemperatur → om testkemikalien färgas ska anpassade living-kontroller genomföras	50 µl (vätskor) eller 25 mg (fasta ämnen) + 300 µl H_2O i 60 min vid 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → om lösningen färgas ska anpassade living-kontroller genomföras
Exponering tid och temperatur	3 min, 60 min (± 5 min) och 240 min (± 10 min) I ventilerad kammare rumstemperatur (RT, 18-28 °C)	3 min i rumstemperatur, och 60 min vid 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min i rumstemperatur, och 60 min vid 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min i rumstemperatur, och 60 min vid 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH
Sköljning	25 ml 1 × PBS (2 ml/gång)	20 gånger med en mjuk och konstant stråle av 1 × PBS	20 gånger med en mjuk och konstant stråle av 1 × PBS	20 gånger med en mjuk och konstant stråle av 1 × PBS

Testmodellernas komponenter	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Negativ kontroll	50 µl saltlösning (9 g/l) Testad för varje exponeringstid	50 µl H_2O Testad för varje exponeringstid	40 µl H_2O Testad för varje exponeringstid	50 µl H_2O Testad för varje exponeringstid
Positiv kontroll	50 µl isättika Testad i endast 4 timmar	50 µl 8N KOH Testad för varje exponeringstid	40 µl 8N KOH Testad i endast 1 timme	50 µl 8N KOH Testad för varje exponeringstid
MTT-lösning	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT-inkubation, tid och temperatur	180 min (± 15 min) vid 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min vid 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min (± 15 min) vid 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min vid 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH
Extraktionslösning	500 µl surgjord isopropanol (0,04 N HCl i isopropanol) (isolerad helt nedsänkt vävnad)	2 ml isopropanol (extraktion från iläggets topp och botten)	1,5 ml isopropanol (extraktion från iläggets topp och botten)	2 ml isopropanol (extraktion från iläggets topp och botten)
Extraktionstid och extraktionstemperatur	Över natten vid rumstemperatur, skyddad från ljus	Över natten utan att skakas, vid rumstemperatur eller i 120 min utan att skakas (~120 rpm) vid rumstemperatur	Över natten utan att skakas, vid rumstemperatur eller i 120 min utan att skakas (~120 rpm) vid rumstemperatur	Över natten utan att skakas, vid rumstemperatur eller i 120 min utan att skakas (~120 rpm) vid rumstemperatur

Testmodellernas komponenter	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Avläst OD-värde	570 nm (545–595 nm) utan referensfilter	570 nm (eller 540 nm) utan referensfilter	570 nm (540–600 nm) utan referensfilter	540–570 nm utan referensfilter
Kvalitetskontroll av vävnaden	18 timmars behandling med SDS 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	Behandling med 1 % Triton X-100 4,08 timmar ≤ ET_{50} ≤ 8,7 timmar	Behandling med 1 % Triton X-100 4,0 timmar ≤ ET_{50} ≤ 10,0 timmar	Behandling med 1 % Triton X-100 2,0 timmar ≤ ET_{50} ≤ 7,0 timmar
Acceptanskriterier	1. Medelvärdet för optisk densitet på de vävnadsreplikat som behandlats med den negativa kontrollen (NaCl) ska vara ≥ 0,6 och ≤ 1,5 för varje exponeringstid. 2. Viabilitetsmedelvärdet för de vävnadsreplikat som exponerats under fyra timmar med den positiva kontrollen (isättika), uttryckt som % av den negativa kontrollen, ska vara ≤ 20 %. 3. Skillnaden i viabilitet mellan två vävnadsreplikat får inte överskrida 30 %, dvs. inom intervallet 20–100 % för viabilitet och ≥ 0,3 när det gäller optisk densitet.	1. Medelvärdet för optisk densitet på de vävnadsreplikat som behandlats med den negativa kontrollen (H_2O) ska vara ≥ 0,8 och ≤ 2,8 för varje exponeringstid. 2. Viabilitetsmedelvärdet för de vävnadsreplikat som exponerats under en timme med den positiva kontrollen (8N KOH), uttryckt som % av den negativa kontrollen, ska vara ≤ 15 %. 3. Inom viabilitetsintervallet på 20–100 % ska variationskoefficienten (CV) mellan vävnadsreplikaten vara ≤ 30 %.	1. Medelvärdet för optisk densitet på de vävnadsreplikat som behandlats med den negativa kontrollen (H_2O) ska vara ≥ 0,8 och ≤ 3,0 för varje exponeringstid. 2. Medelviabilitetsvärdet för de vävnadsreplikat som exponerats i en timme (och i fyra timmar, i förekommande fall) med den positiva kontrollen (8N KOH), uttryckt som % av den negativa kontrollen, ska vara < 15 %. 3. Vid ett viabilitetsintervall på 20–100 % och ett OD-värde på ≥ 0,3 får skillnaden i viabilitet mellan de två vävnadsreplikaten inte överskrida 30 %.	1. Medelvärdet för optisk densitet på de vävnadsreplikat som behandlats med den negativa kontrollen (H_2O) ska vara ≥ 0,8 och ≤ 2,8 för varje exponeringstid. 2. Viabilitetsmedelvärdet för de vävnadsreplikat som exponerats under en timme med den positiva kontrollen (8N KOH), uttryckt som % av den negativa kontrollen, ska vara < 20 %. 3. Vid ett viabilitetsintervall på 20–100 % och ett OD-värde på ≥ 0,3 får skillnaden i viabilitet mellan de två vävnadsreplikaten inte överskrida 30 %.

Tillägg 3

TESTMODELLERNAS PRESTANDA FÖR UNDERKATEGORISERING

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

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

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

PREDIKTIONSSTATISTIK FÖR SAMTLIGA KEMIKALIER

(n = 80 kemikalier som testats i två oberoende testomgångar för epiCS® eller i tre oberoende testomgångar för EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ och SkinEthic™ RHE, dvs. 159 (*) respektive 240 klassificeringar)

	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Överklassificeringar:				
1B-och-1C överklassificerade 1A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
NC överklassificerade 1B och 1C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
NC överklassificerade 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
överklassificerade korr.	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Global överklassificeringsgrad (samtliga kategorier)	**17,9 %**	**23,3 %**	**24,5 %**	**25,8 %**
Underklassificeringar:				
1A underklassificerade 1B och 1C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A underklassificerade NC	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B och 1C underklassificerade NC	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Global underklassificeringsgrad (samtliga kategorier)	**3,3 %**	**2,5 %**	**5,4 %**	**4,4 %**
Korrekta klassifikationer:				
1A korrekt klassificerad	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
1B och 1C korrekt klassificerade	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
NC korrekt klassificerad	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Total noggrannhet	**78,8 %**	**74,2 %**	**70 %**	**69,8 %**

NC: Icke frätande

(*) en kemikalie testades endast en gång i epiCS® på grund av bristande tillgång (23).

Tillägg 4

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

Parametrar	Protokoll baserat på FDA:s vägledning (37) (38)	Acceptanskriterier
Selektivitet	Analys av isopropanol, blanka levande kontroller (isopropanolextrakt från obehandlad levande RhE-vävnad), blanka döda kontroller (isopropanolextrakt från obehandlad död RhE-vävnad)	$Area_{interferens} \leq 20\ \%$ av $area_{LLOQ}$ ([1])
Precision	Kvalitetskontroller (dvs. MTT-formazan vid 1,6 µg/ml, 16 µg/ml och 160 µg/ml) i isopropanol (n = 5)	CV ≤ 15 % eller ≤ 20 % för LLOQ
Noggrannhet	Kvalitetskontroller i isopropanol (n = 5)	% Dev ≤ 15 % eller ≤ 20 % för LLOQ
Matriseffekt	Kvalitetskontroller i levande blankprov (n = 5)	85 % ≤ matriseffekt i % ≤ 115 %
Återföring (carry over)	Analys av isopropanol mot en $ULOQ^2$-standard ([2])	$Area_{interference} \leq 20\ \%$ av $area_{LLOQ}$
Reproducerbarhet (inom en dag)	Tre oberoende kalibreringskurvor (baserade på 6 konsekutiva 1/3-spädningar av MTT-formazan i isopropanol med början vid ULOQ, dvs. 200 µg/ml); Kvalitetskontroller i isopropanol (n = 5)	Kalibreringskurvor: % Dev ≤ 15 % eller ≤ 20 % för LLOQ Kvalitetskontroller: % Dev ≤ 15 % och CV ≤ 15 %
Reproducerbarhet (mellan dagar)	Dag 1: En kalibreringskurva och kvalitetskontroller i isopropanol (n = 3) Dag 2: En kalibreringskurva och kvalitetskontroller i isopropanol (n = 3) Dag 3: En kalibreringskurva och kvalitetskontroller i isopropanol (n = 3)	
MTT-formazanets kortsiktiga stabilitet i RhE-vävnadsextrakt	Kvalitetskontroller i blanka levande kontroller (n = 3) som analyserats på dagen för beredningen samt efter 24 timmars förvaring i rumstemperatur	% Dev ≤ 15 %
MTT-formazanets långsiktiga stabilitet i RhE-vävnadsextrakt, i förekommande fall	Kvalitetskontroller i blanka levande kontroller (n = 3) som analyserats på dagen för beredningen samt efter flera dagars förvaring vid specifik temperatur (t.ex. 4 °C, −20 °C, −80 °C)	%Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: Undre kvantifieringsgräns, definierad för att omfatta 1–2 % vävnadsviabilitet, dvs. 0,8 µg/ml.
([2]) ULOQ: Övre kvantifieringsgräns, definierad för att vara minst dubbel så hög som den högsta förväntade koncentrationen av MTT-formazan i isopropanolextrakt från negativa kontroller, dvs. 200 µg/ml.

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

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

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 439 (2015). Med hudirritation avses uppkomsten av en reversibel skada på huden efter applicering av en testkemikalie i upp till fyra timmar, enligt definitionen i Förenta nationernas globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (1) och Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP) ([1]). Denna testmetod beskriver ett in vitro-förfarande som kan användas för identifiering av faror med irriterande kemikalier (ämnen och blandningar) enligt GHS/CLP-kategori 2 (2). I regioner som inte har antagit den valfria GHS-kategorin 3 (svagt irriterande ämnen) kan denna testmetod även användas för att identifiera icke-klassificerade kemikalier. Beroende på gällande lagstiftning och det klassificeringssystem som används kan denna testmetod därför användas för att bestämma huruvida kemikalier är irriterande för huden, antingen som ett självständigt test som ersätter in vivo-testning för hudirritation eller som ett partiellt ersättningstest inom ramen för en teststrategi (3).

2. Bedömningen av hudirritation har i regel inneburit användning av försöksdjur (TM B.4, likvärdig med OECD TG 404 som antogs 1981 och reviderades 1992, 2002 och 2015) (4). Tre validerade in vitro-testmetoder har antagits för testning av korrosivitet: EU TM B.40 (likvärdig med OECD TG 430), TM B.40a (likvärdig med OECD TG 431) och TM B.65 (likvärdig med OECD TG 435) (5) (6) (7). I OECD:s vägledningsdokument om ett integrerat synsätt på testning och bedömning (IATA) av hudkorrosion och hudirritation beskrivs flera moduler som grupperar olika informationskällor och analysverktyg, och där ges också i) vägledning om hur tillgängliga testdata och icke testdata kan integreras och användas i bedömningen av kemikaliers potential för hudirritation och hudkorrosion och ii) förslag på hur man ska gå till väga när det krävs ytterligare testning (3).

3. Denna testmetod gäller endpointen hudirritation hos människa. Den baseras på ett in vitro-testsystem av rekonstruerad human epidermis (RhE), som nära efterliknar de övre delarna av människans hud (dvs. epidermis) vad gäller biokemiska och fysiologiska egenskaper. RhE-testsystemet använder sig av icke-transformerade humana keratinocyter som cellkälla för att skapa en epidermismodell med representativ histologi och cytoarkitektur. Det finns prestandastandarder (PS) som underlättar validering och bedömning av liknande eller modifierade RhE-baserade testmetoder, i enlighet med OECD:s vägledningsdokument nr 34 (8) (9). Motsvarande testriktlinje antogs för första gången 2010 och uppdaterades 2013 för att inkludera ytterligare RhE-modeller, och 2015 för att ta med hänvisningar till vägledningsdokumentet om IATA och introducera användningen av en alternativ metod för mätning av viabilitet.

4. Förvalideringsstudier, optimeringsstudier och valideringsstudier har slutförts för fyra in vitro-testmodeller som är tillgängliga i handeln (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) och som är baserade på RhE-testsystemet (80 % sensitivitet, 70 % specificitet och 75 % noggrannhet). Dessa fyra testmodeller ingår i denna testmetod och förtecknas i tillägg 2, där man också hittar information om vilken typ av valideringsstudie som använts för att validera respektive testmetod. Som anges i tillägg 2 har den validerade referensmetoden (VRM) använts för att utveckla denna testmetod och prestandastandarderna (8).

5. OECD:s ömsesidiga dataacceptans kan endast garanteras för testmodeller som validerats enligt prestandastandarderna (8) och granskats och antagits av OECD. De testmodeller som ingår i denna testmetod och motsvarande OECD-testriktlinjer kan båda användas för att möta olika länders krav på testresultat från in vitro-testmetoder för hudirritation, tack vare den ömsesidiga dataacceptansen.

6. Definitioner för termer som används i detta dokument ges i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

7. En begränsning hos testmetoden, såsom påvisas i den fullständiga prospektiva valideringsstudie som bedömt och karaktäriserat RhE-testmetoder (16), är att den inte möjliggör klassificering av kemikalier för den frivilliga GHS-kategorin 3 (svagt irriterande ämnen) (1). Därför kommer lagstiftningen i respektive medlemsland att avgöra hur denna testmetod ska användas. Kategori 3 har inte antagits i CLP inom EU. För en fullständig bedömning av lokala effekter på huden efter en enstaka dermal exponering, se OECD:s vägledningsdokument om IATA (3). Användningen av human hud är föremål för nationella och internationella etiska överväganden och begränsningar.

([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).

8. Denna testmetod gäller endpointen hudirritation hos människa. Även om denna testmetod inte ger tillräcklig information om hudkorrosion bör noteras att TM B.40a (likvärdig med OECD TG 431) om hudkorrosion baseras på samma RhE-testsystem, om än med användning av ett annat protokoll (6). Denna testmetod baseras på RhE-modeller med humana keratinocyter, som därför representerar målorganet in vitro hos den art det gäller. Metoden täcker dessutom direkt det inledande steget hos den inflammatoriska kaskaden/verkningssmekanismen (cell- och vävnadsskada som leder till lokaliserat trauma) som inträffar vid irritation in vivo. Ett stort spektrum av kemikalier har testats vid den validering som ligger till grund för denna testmetod, och valideringsstudiens databas omfattade totalt 58 kemikalier (16) (18) (23). Testmetoden kan tillämpas på fasta ämnen, vätskor, halvfasta ämnen och vaxer. Vätskorna kan vara vattenbaserade eller inte. fasta ämnen kan vara lösliga eller olösliga i vatten. När det är möjligt bör ämnen i fast form pulveriseras före applicering, ingen annan förbehandling av provet krävs. Gaser och aerosoler har ännu inte bedömts genom valideringsstudier (29). Det är tänkbart att de kan testas med RhE-teknik, men den aktuella testmetoden ger inte möjlighet att testa gaser och aerosoler.

9. Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag. Med tanke på att blandningar omfattar en stor mängd kategorier och sammansättningar och det i nuläget endast finns begränsad information om testning av blandningar bör dock testmetoden inte användas på blandningskategorier för vilka den har visat sig vara icke-tillämplig (t.ex. i enlighet med den strategi som föreslås av Eskes m.fl. 2012 (30)). Liknande försiktighet bör iakttas när specifika kemiska klasser eller fysikalisk-kemiska egenskaper visar sig inte vara tillämpliga för denna testmetod.

10. Testkemikalier som absorberar lika mycket ljus som MTT-formazan och testkemikalier som direkt kan reducera vitalfärgämnet MTT (till MTT-formazan) kan påverka cellviabilitetsmätningen och kräver därför anpassade kontroller för att korrigeras (se punkterna 28–34).

11. En enda testomgång med tre vävnadsreplikat bör vara tillräckligt för en testkemikalie förutsatt att klassificeringen är otvetydig. Om man får resultat som ligger på gränsen, t.ex. icke-konkordanta replikatmätningar och/eller en genomsnittlig procentuell viabilitet på 50 ± 5 %, bör man dock överväga en andra testomgång, och en tredje omgång om resultaten mellan de två första omgångarna är diskordanta.

TESTPRINCIP

12. Testkemikalien appliceras lokalt på en tredimensionell RhE-modell som består av icke-transformerade epidermala keratinocyter av humant ursprung som har odlats till att bilda en starkt differentierad modell av human hud i flera lager. Den består av ordnade skikt i form av basallager, taggcellslager och granulärt lager samt ett flerskiktat hornlager innehållande intercellulära lamellära lipidlager av de huvudsakliga lipidklasser som motsvarar dem som förekommer in vivo.

13. Kemiskt inducerad hudirritation, som manifesteras framför allt som hudrodnad och ödem, är resultatet av en händelsekedja som börjar med att kemikalier penetrerar hornlagret, där de kan skada de underliggande lagren av keratinocyter och andra hudceller. De skadade cellerna kan antingen avge inflammatoriska mediatorer eller orsaka en inflammatorisk kaskad som även påverkar cellerna i huden, särskilt stromacellerna och endotelcellerna i blodkärlen. Det är utvidgningen och den ökade permeabiliteten hos endotelcellerna som ger upphov till de hudrodnader och ödem som kan observeras (29). Vid avsaknad av vaskularisering i in vitro-testsystemet mäter de RhE-baserade testmetoderna kaskadens inledande effekter, t.ex. cell- och vävnadsskador (16) (17) och avläser dessa utifrån cellviabilitet.

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

DEMONSTRATION AV KOMPETENS

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

Tabell 1

Kvalifikationsämnen ([1])

Ämne	CAS-nr	In vivo-gradering ([2])	Fysikaliskt tillstånd	GHS-kategori
ICKE-KLASSIFICERADE ÄMNEN (”ingen kategori” enligt GHS)				
naftalenättiksyra	86-87-3	0	Fasta ämnen	Ingen kat.
Isopropanol	67-63-0	0,3	Vätskor	Ingen kat.
metylstearat	112-61-8	1	Fasta ämnen	Ingen kat.
heptylbutyrat	5870-93-9	1,7	Vätskor	Ingen kat. (*Valfri kat. 3*) ([3])
hexylsalicylat	6259-76-3	2	Vätskor	Ingen kat. (*Valfri kat. 3*) ([3])
KLASSIFICERADE ÄMNEN (GHS-kategori 2)				
cyklamenaldehyd	103-95-7	2,3	Vätskor	Kat. 2
1-bromhexan	111-25-1	2,7	Vätskor	Kat. 2
kaliumhydroxid (5 % vattenlöslig)	1310-58-3	3	Vätskor	Kat. 2
1-metyl-3-fenyl-1-piperazin	5271-27-2	3,3	Fasta ämnen	Kat. 2
heptanal	111-71-7	3,4	Vätskor	Kat. 2

([1]) Kvalifikationsämnena är en underuppsättning av de ämnen som används i valideringsstudien, och urvalet baseras på följande kriterier: i) de kemiska ämnena ska finnas tillgängliga i handeln, ii) de ska vara representativa för hela urvalet av Draizes irritationspoäng (från icke-irriterande till starkt irriterande), iii) de ska ha en väldefinierad kemisk struktur; iv) de ska vara representativa för den kemiska funktionalitet som används i valideringsprocessen, v) de ska ha gett reproducerbara resultat in vitro vid flera tester och i flera laboratorier, vi) de ska ha kunnat förutses korrekt in vitro, och vii) de får inte vara extremt toxiska (t.ex. cancerframkallande eller toxiska för fortplantningssystemet) eller belagda med några kostnader för farligt avfall.
([2]) In vivo-gradering enligt TM B.4 (4).
([3]) I denna testmetod betraktas den valfria GHS-kategorin 3 (svagt irriterande ämnen) (1) som ”ingen kategori”.

FÖRFARANDE

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

RHE-TESTMETOD, KOMPONENTER

Allmänna betingelser

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

Funktionella betingelser

Viabilitet

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

Tabell 2

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

	Nedre gräns för godkännande	Acceptansintervallets övre gräns
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Barriärfunktion

20. Hornlagret och dess lipidsammansättning ska räcka till för att stå emot snabb penetrering av cytotoxiska markörkemikalier, t.ex. SDS eller Triton X-100, enligt uppskattningar genom IC_{50} eller ET_{50} (tabell 3).

Morfologi

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

Reproducerbarhet

22. Resultaten för testmetodens positiva och negativa kontroller bör visa reproducerbarhet över tid.

Kvalitetskontroll

23. Utvecklaren/leverantören av RhE-modellen bör säkerställa och påvisa att varje sats RhE-modell som används uppfyller de fastställda produktkriterierna, där kriterierna för *viabilitet* (punkt 19), *barriärfunktion* (punkt 20) och *morfologi* (punkt 21) är de viktigaste. Dessa data bör ges till metodanvändarna så att de kan införliva informationen i testrapporten. Utvecklaren/leverantören av RhE-modellen bör fastställa acceptabla gränsvärden (övre och nedre gräns) för IC_{50} eller ET_{50}. Endast resultat som har producerats med kvalificerade vävnader kan godkännas för tillförlitlig prediktion av irritationsklassificering. I tabell 3 anges de acceptabla gränsvärdena för de fyra testmodeller som ingår i denna testmetod.

Tabell 3

Kvalitetskriterier för godkännande för de testmodeller som ingår i denna testmetod

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

Applicering av testkemikalien och kontrollämnen

24. Minst tre vävnadsreplikat ska användas per testkemikalie och för kontrollerna i varje omgång. För vätskor och fasta ämnen appliceras en tillräcklig mängd av testkemikalien så att hudens yta täcks med ett jämnt lager så att en infinit dos undviks. Dosen ska vara minst 26–83 µl/cm^2 eller mg/cm^2 (se tillägg 3). För fasta ämnen fuktas hudens yta med avjoniserat eller destillerat vatten före appliceringen för att förbättra kontakten mellan testkemikalien och hudens yta. När det är möjligt ska fasta ämnen testas i form av ett fint pulver. Ett nylonnät kan användas till spridningen i vissa fall (se tillägg 3). Vid slutet av exponeringsperioden tvättas testkemikalien omsorgsfullt bort från hudens yta med buffrad vattenlösning eller 0,9-procentig NaCl. Beroende på vilken RhE-testmodell som används kan exponeringstiden variera från 15 till 60 minuter, och inkubationstemperaturen mellan 20 och 37 °C. Exponeringsperioderna och exponeringstemperaturerna optimeras för varje enskild RhE-testmetod och representerar testmodellernas olika egenskaper (t.ex. barriärfunktion) (se tillägg 3).

25. Negativa kontroller (NC) och positiva kontroller (PC) ska användas parallellt vid varje testomgång för att visa att viabiliteten (med NC) samt barriärfunktionen och den resulterande känsligheten (med PC) hos vävnaderna ligger inom fastställda godkända historiska värden. För den positiva kontrollen föreslås 5-procentig vattenlösning av natriumdodecylsulfat. För den negativa kontrollen föreslås vatten eller fosfatbuffrad saltlösning.

Mätning av cellernas viabilitet

26. Den viktigaste faktorn i testningsförfarandet är att viabilitetsmätningarna inte utförs omedelbart efter exponeringen för testkemikalien, utan först efter att de sköljda vävnaderna har haft en tillräckligt lång inkubationstid i färskt medium efter behandlingen. Under denna period kan vävnaderna antingen återhämta sig från svagt irriterande effekter eller utveckla tydliga cytotoxiska effekter. En inkubationsperiod på 42 timmar efter behandling har visat sig vara det optimala efter testoptimering av två av de RhE-baserade testmodeller som ligger till grund för denna testmetod (11) (12) (13) (14) (15).

27. MTT-metoden är en validerad kvantitativ metod som ska användas i denna testmetod för att mäta cellviabiliteten. Den kan användas på en tredimensionell vävnadsmodell. Vävnadsprovet placeras i en MTT-lösning av lämplig koncentration (t.ex. 0,3–1 mg/ml) i 3 timmar. De viabla cellerna omvandlar MTT till blått formazan. Fällningen i form av blått formazan extraheras sedan från vävnaden med ett lösningsmedel (t.ex. isopropanol, sur isopropanol), och formazankoncentrationen mäts genom bestämning av OD vid 570 nm med ett filterbandpass på högst ± 30 nm eller med hjälp av en HPLC/UPLC-spektrofotometerprocedur (se punkt 34) (36).

28. Testkemikaliens optiska egenskaper eller kemiska verkan på MTT kan störa bestämningen, vilket leder till en felaktig uppskattning av viabiliteten (testkemikalien kan förhindra eller vända färgutvecklingen, men kan även vara orsaken till den). Detta kan ske när en specifik testkemikalie inte avlägsnas fullständigt från vävnaden genom sköljning eller när den penetrerar överhuden. Om testkemikalien verkar direkt på MTT (t.ex. genom att reducera MTT), är naturligt färgad eller färgas under behandlingen av vävnaden, bör ytterligare kontroller göras så att man kan upptäcka och korrigera för testkemikaliens störande inverkan på tekniken för mätning av viabiliteten (se punkterna 29 och 33). Detaljerad beskrivning hur direkt MTT-reduktion och störningar av färgämnen kan korrigeras finns i de operativa standardförfarandena för de tre validerade metoderna (32) (33) (34) (35).

29. För att identifiera vilka av testkemikalierna som reducerar MTT bör de tillsättas en och en till ett nypreparerat MTT-medium. Om MTT-blandningen som innehåller testkemikalien färgas blå/lila kan testkemikalien antas reducera MTT direkt, och då bör en ytterligare funktionskontroll utföras på icke-viabel RhE-vävnad, oberoende av om en mätning av standardabsorbans (OD) eller en HPLC/UPLC-spektrofotometerprocedur har använts. I nämnda funktionskontroll ska död vävnad användas som endast har residual metabolisk aktivitet men som kan absorbera testkemikalien på ett liknande sätt som viabla vävnader. Varje testkemikalie som reducerar MTT ska appliceras på minst två döda vävnadsreplikat vilka sedan genomgår hela testproceduren för att generera icke-specifik MTT-reduktion (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Det räcker med en enda NSMTT-kontroll per testkemikalie oavsett antalet oberoende test/omgångar som genomförs. Därefter beräknas vävnadens faktiska viabilitet utifrån procentandelen viabel vävnad som har exponerats för en MTT-reducerare minus procentandelen icke-specifik MTT-reduktion som erhålls från den döda vävnad som har exponerats för samma MTT-reducerare, och detta beräknas genom en jämförelse med den negativa kontroll som gjorts parallellt för det test som korrigeras (%NSMTT).

30. För att identifiera potentiell interferens av färgade testkemikalier eller av testkemikalier som färgas vid kontakt med vatten eller isopropanol och för att kunna avgöra om ytterligare kontroller behövs bör en spektral analys av testkemikalien utföras i vatten (miljö under exponering) och/eller i isopropanol (extraherande lösningsmedel). Om testkemikalien, när den ligger i vatten och/eller isopropanol, absorberar ljus inom ett intervall på 570 ± 30 nm bör ytterligare färgningskontroller utföras, och om sådana kontroller inte behövs bör en HPLC/UPLC-spektrofotometerprocedur användas (se punkterna 33 och 34). Vid mätningen av standardabsorbans (OD) ska varje färgad interfererande testkemikalie appliceras på minst två viabla vävnadsreplikat, och dessa ska genomgå hela testet men inkuberas med medium i stället för MTT-lösning under MTT-inkuberingsfasen för att generera en icke-specifik färgkontroll (NSC_{living}). NSC_{living}-kontrollen ska utföras parallellt med testningen av den färgade testkemikalien, och när flera tester utförs krävs en oberoende NSC_{living}-kontroll för varje genomfört test (i varje omgång) beroende på den levande vävnadens inneboende biologiska mångfald. Därefter beräknas vävnadens faktiska viabilitet efter procentandelen levande vävnad som erhålls efter det att den levande vävnaden har exponerats för en interfererande testkemikalie och inkuberats med en MTT-lösning minus procentandelen icke-specifik färg som erhålls från levande vävnad som har exponerats för den interfererande testkemikalien och inkuberats i ett medium utan MTT, parallellt med det test som korrigeras ($\%NSC_{living}$).

31. Testkemikalier som konstaterats orsaka både direkt MTT-reduktion (se punkt 29) och färginterferens (se punkt 30) kräver en tredje typ av kontroller utöver de NSMTT- och NSC_{living}-kontroller som beskrivs ovan, vid mätningen av standardabsorbans (OD). Detta är vanligtvis fallet med mörkt färgade testkemikalier som interfererar med MTT-testet (t.ex. blå, lila, svart) eftersom deras naturliga färg gör det omöjligt att bedöma om de reducerar MTT direkt så som beskrivs i punkt 29. Dessa testkemikalier kan bindas till både levande och död vävnad, och en NSMTT-kontroll kan då utöver att korrigera den potentiella direkta MTT-reduktionen även

korrigera den färginterferens som uppstår när testkemikalien binds till död vävnad. Detta kan leda till en dubbel korrigering av färginterferens eftersom NSC_{living} redan korrigerar färginterferens som uppstår när testkemikalien binds till levande vävnad. För att undvika dubbel korrigering av färginterferens krävs en tredje kontroll anpassad för icke-specifik färg i död vävnad (NSC_{killed}). Vid nämnda kontroll appliceras testkemikalien på minst två döda vävnadsreplikat vilka sedan genomgår hela testproceduren men inkuberas i ett medium i stället för i en MTT-lösning under MTT-inkubationsfasen. Det räcker med en enda NSC_{killed}-kontroll per testkemikalie oavsett antalet oberoende test/omgångar som har utförts, men kontrollen bör genomföras parallellt med NSMTT-kontrollen och, om det är möjligt, med samma sats av vävnadsprover. Därefter beräknas vävnadens faktiska viabilitet efter procentandelen levande vävnad som erhålls efter det att den levande vävnaden har exponerats för en interfererande testkemikalie och inkuberats med en MTT-lösning minus %NSMTT minus $\%NSC_{living}$ plus procentandelen icke-specifik färg som erhålls från levande vävnad som har exponerats för den interfererande testkemikalien och inkuberats i ett medium utan MTT, beräknat efter den negativa kontroll som utförts parallellt med det test som korrigeras ($\%NSC_{killed}$).

32. Observera att icke-specifik MTT-reduktion och icke-specifik färginterferens kan öka avläsningen av vävnadsprovet så att det överskrider spektrofotometerns linjeintervall. Laboratoriet ska därför fastställa spektrofotometerns linjära område med MTT-formazan (CAS-nr 57360-69-7) från en kommersiell källa innan försök med testkemikalier för lagstadgade ändamål inleds. Mätningen av standardabsorbans (OD) med hjälp av spektrofotometer är lämplig för bedömning av vilka kemikalier som direkt reducerar MTT eller orsakar färginterferens i de fall vävnadsproverna, utan att ha korrigerats för direkt MTT-reduktion och/eller färginterferens, ger OD-värden som ligger inom spektrofotometerns linjeintervall eller i de fall testkemikalien ger en procentandel viabilitet som redan före korrigering är ≤ 50 %. Dock bör resultat från testkemikalier som producerar %NSMTT och/eller $\%NSC_{living}$ som är ≥ 50 % av den negativa kontrollen beaktas med försiktighet, eftersom detta är det gränsvärde som används för att skilja klassificerade kemikalier från icke-klassificerade (se punkt 36).

33. För färgade testkemikalier som inte är kompatibla med mätningen av standardabsorbans (OD) på grund av alltför stark interferens vid MTT-testet kan en alternativ HPLC/UPLC-spektrofotometerprocedur användas för att mäta MTT-formazan (se punkt 34) (36). HPLC/UPLC-spektrofotometersystemet gör det möjligt att separera MTT-formazanet från testkemikalien före kvantifiering (36). Därför behövs aldrig NSC_{living} eller NSC_{killed}-kontroller vid användning av HPLC/UPLC-spektrofotometerteknik oberoende av vilken kemikalie som testas. NSMTT-kontroller ska dock användas när det finns misstankar om att testkemikalien reducerar MTT direkt eller när den har en färg som gör det omöjligt att bedöma huruvida den kan reducera MTT direkt (enligt beskrivningen i punkt 29). Vid användning av HPLC/UPLC-spektrofotometri för att mäta MTT-formazan beräknas vävnadens viabilitet som förhållandet (i procent) mellan å ena sidan den topparea för MTT-formazan som erhållits med levande vävnad exponerad för testkemikalien och, å andra sidan, den topparea för MTT-formazan som erhållits med den parallellt utförda negativa kontrollen. För testkemikalier som kan reducera MTT direkt beräknas vävnadens viabilitet genom den levande vävnadens viabilitet i procent minus %NSMTT. Slutligen bör nämnas att kemikalier som direkt reducerar MTT även kan orsaka färginterferens, vilken stannar kvar i vävnaden efter behandling och reducerar MTT så starkt att de orsakar OD-värden (påvisbart genom OD-standardmätning) eller toppareor (påvisbart genom användning av en UPLC/HPLC- spektrofotometer) på de testade vävnadsextrakt som faller utom spektrofotometerns linjeintervall och därför inte kan bedömas. Detta är dock väldigt ovanligt.

34. HPLC/UPLC-spektrofotometersystem kan användas för att mäta MTT-formazan för alla typer av testkemikalier (färgade, icke-färgade, de som reducerar MTT och de som inte gör det) (36). På grund av mångfalden av HPLC/UPLC-spektrofotometersystem ska HPLC/UPLC-spektrofotometersystemets godtagbarhet demonstreras innan det används för att kvantifiera MTT-formazan från vävnadsextrakt, genom att systemet uppfyller acceptanskriterierna för en uppsättning standardkvalifikationsparametrar som baseras på dem som beskrivs i FDA:s vägledning för industrin om bioanalytisk metodvalidering (36) (37). Dessa nyckelparametrar och deras acceptanskriterier anges i tillägg 4. När de acceptanskriterier som anges i tillägg 4 är uppfyllda ska HPLC/UPLC-spektrofotometersystemet anses vara godkänt och färdigt att användas för mätning av MTT-formazan under de testbetingelser som beskrivs i denna testmetod.

Acceptanskriterier

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

Tolkning av resultaten och prediktionsmodell

36. De OD-värden som erhålls för varje testkemikalie kan användas för att beräkna procentuell viabilitet jämfört med den negativa kontrollen, som fastställs till 100 %. Vid användning av HPLC/UPLC-spektrofotometri beräknas vävnadens viabilitet som förhållandet (i procent) mellan å ena sidan den topparea för MTT-formazan som erhållits med levande vävnad exponerad för testkemikalien och, å andra sidan, den topparea för MTT-formazan som erhållits med den parallellt utförda negativa kontrollen. Det procentuella viabilitetsgränsvärdet skiljer irriterande testkemikalier från icke-klassificerade testkemikalier, och det eller de statistiska förfarande(n) som används för att utvärdera resultaten och identifiera irriterande ämnen ska vara klart definierade och dokumenterade och ska vara bevisat lämpliga (se testmodellernas SOP för mer information). Gränsvärdena för prediktion av irritation anges nedan:

— Testkemikalien identifieras som en kemikalie som kräver klassificering och märkning enligt GHS/CLP (kategori 2 eller kategori 1) om vävnadens genomsnittliga viabilitet efter exponering och efterföljande inkubation är lägre eller lika med (≤) 50 %. Eftersom RhE-testmodellerna i denna testmetod inte kan skilja mellan kategorierna 1 och 2 i GHS/CLP krävs ytterligare information om hudkorrosion för att avgöra den slutliga kemikalieklassen (se även OECD:s vägledningsdokument om IATA (3)). Om testkemikalien bedöms vara icke frätande (t.ex. utifrån TM.40, B.40a eller B.65) och uppvisar en vävnadsviabilitet på lägre eller lika med (≤) 50 % efter exponering och efterföljande inkubation ska testkemikalien klassas som irriterande för huden, i enlighet med GHS/CLP-kategori 2.

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

DATA OCH RAPPORTERING

Data

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

Testrapport

38. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie och kontrollkemikalier:

— Monokomponentämne: kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.

— Multikomponentämne, UVCB och blandningar: karakteriseras så långt som möjligt genom beståndsdelarnas kemiska identitet (se ovan), kvantitativa förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Fysikaliskt tillstånd, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Ursprung, satsnummer om sådant finns.

— Behandling av test-/kontrollkemikalierna före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).

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

— Lagringsförhållanden.

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

Testbetingelser:

— RhE-modell (inklusive satsnummer).

— Kalibreringsinformation för mätningsinstrument (t.ex. spektrofotometer, våglängd och filterbandpass (i förekommande fall) som har använts för kvantifiering av MTT-formazan, samt mätinstrumentets linjeintervall. Beskrivning av den metod som har använts för att kvantifiera MTT-formazan.

— Beskrivning av kvalitetsbestämningen av HPLC/UPLC-spektrofotometersystemet (i förekommande fall). Fullständig stödjande information för den specifika RhE-modell som använts, inklusive modellens prestanda. Informationen ska omfatta men inte vara begränsad till följande:

i) viabilitet,

ii) barriärfunktion,

iii) morfologi,

iv) reproducerbarhet och förutsägbarhet, och

v) kvalitetskontroller av modellen.

— Hänvisning till historiska uppgifter om modellen. I denna hänvisning ska bland annat framgå huruvida kvalitetskontrolldata är godtagbara med avseende på historiska data om respektive sats.

— Demonstrationen av kompetens för utförande av testmetoden ska göras före rutinanvändning, genom testning av kvalifikationsämnen.

Provningsförfarande:

— Detaljerad beskrivning av testet (inklusive tvättning efter exponering). Dosen för testkemikalien respektive kontrollkemikalier.

— Exponeringstid och exponeringstemperatur samt inkubationsperiod efter exponering.

— Uppgifter om kontroller som använts för direkt MTT-reduktion och/eller färgade testkemikalier, i förekommande fall.

— Antal vävnadsreplikat som använts per testkemikalie och kontroll (PC, negativa kontroller och NSMTT, NSC_{living} och NSC_{killed}, i förekommande fall).

— Beskrivning av beslutskriterierna/den prediktionsmodell som använts beroende på RhE-modell.

— Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet (inklusive tvättningsförfarandet).

Acceptanskriterier för testet och omgången:

— Medelvärden och godtagbara intervall för parallella positiva och negativa kontroller på grundval av historiska data. Acceptabel variabilitet mellan vävnadsreplikaten för negativa och positiva kontroller.

— Acceptabel variabilitet mellan vävnadsreplikaten som behandlats med testkemikalien.

Resultat:

— Redovisning i tabellform av individuella testkemikalier för varje testomgång och replikatmätning inklusive OD-värden eller toppareor för MTT-formazan, vävnadsviabilitet i procent, vävnadens medelviabilitet i procent samt standardavvikelse.

— I förekommande fall även resultaten från de kontroller som använts för ämnen som direkt reducerar MTT och/eller för färgande testkemikalier, inklusive OD-värden eller toppareor för MTT-formazan, %NSMTT, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, standardavvikelse och den slutliga korrekta vävnadsviabiliteten i procent.

— Resultaten för testkemikalier och kontrollkemikalie utifrån definierade acceptanskriterier för omgången och testet.

— Beskrivning av övriga observerade effekter.

— Härledda klassificeringar med hänvisning till prediktionsmodell och/eller beslutskriterier.

Diskussion av resultaten

Slutsatser

LITTERATUR

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), andra reviderade utgåvan, FN New York och Genève, 2013. Tillgänglig på: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) EURL-ECVAM (2009). Uttalande om "Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards", utfärdat av ECVAM:s vetenskapliga rådgivande kommitté (ESAC31), 9 april 2009. Tillgänglig på: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf

(3) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 203, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(4) Kapitel B.4 i denna bilaga, Akut hudirritation/hudkorrosion.

(5) Kapitel B.40 i denna bilaga, Hudkorrosion in vitro: Transkutant elektriskt motstånd (TER).

(6) Kapitel B.40a i denna bilaga, Hudkorrosion in vitro: Testmetod med rekonstruerad human epidermis (RhE).

(7) Kapitel B.65 i denna bilaga, In vitro-membranbarriärtest för hudkorrosion.

(8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 34, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. och Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. och Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. och Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, s. 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.–H., Portes, P., Roguet, R. och Rubinsteen, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, s. 329–349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. och Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.

(16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. och Zuang, V. (2007). ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.

(17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α.

(18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. och Zuang, V. (2007). ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, s. 603–619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. och Leclaire, J. (2007). *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy – Results and performances with 184 cosmetic ingredients, *AATEX*, Special Issue-proceedings from WC6. vol. 14, s. 351–358.

(20) EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, utfärdat av ECVAM:s vetenskapliga rådgivande kommitté (ESAC26), den 27 april 2007. Tillgänglig på: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf

(21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *Anm. Detta är de ursprungliga PS som använts för validering av de två testmetoderna. Dessa PS ska inte användas längre eftersom det nu finns en uppdaterad version (8).*

(22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf

(23) OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment nr 137, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. och Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol* Sci, vol. 34, s. 327–334.

(25) Katoh, M. och Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, vol. 16, s. 111–122.

(26) OECD (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 159, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(27) OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 155, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. och Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.

(29) Welss, T., Basketter, D.A. och Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* kapitel 18, s. 231–243.

(30) Eskes C. m.fl. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol*.Pharmacol. vol. 62, s. 393–403.

(31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* vol. 65, s. 55–63.

(32) EpiSkin™ (februari 2009). SOP, Version 1.8ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals

(33) EpiDerm™ (omarbetad i mars 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).

(34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.

(35) LabCyte (juni 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model "LabCyte EPI-MODEL24"

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Manus under bearbetning.

(37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Maj 2001. Finns på [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

(38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., och Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, i: Practical Contact Dermatitis, s. 7–18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *Anm. Detta är den nu gällande versionen av ECVAM:s PS, uppdaterad 2009 för genomförandet av GHS. Dessa PS ska inte användas längre eftersom det nu finns en uppdaterad version för gällande riktlinjer (8).*

(40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.

(41) Europeiska kommissionen (2001). Kommissionens direktiv 2001/59/EG av den 6 augusti 2001 om anpassning till tekniska framsteg för tjugoåttonde gången av rådets direktiv 67/548/EEG om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen (EGT L 225, 21.8.2001, s. 1).

Tillägg 1

DEFINITIONER

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

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

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

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

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

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

HPLC: Högupplösande vätskekromatografi.

IATA: ett integrerat synsätt på testning och bedömning.

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

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

Blandning: 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.

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

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.

NSC_{killed}: Icke-specifik färg i avdödade vävnader.

NSC_{living}: Icke-specifik färg i levande vävnader.

NSMTT: Icke-specifik MTT-reduktion (Non-Specific MTT).

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

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

Relevans: 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 väl man genom testet korrekt kan mäta och prediktera den biologiska effekt det gäller. Relevans omfattar också överväganden om en testmetods noggrannhet (konkordans) (9).

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

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

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

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

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

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

Ämne: 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 denna testmetod.

UPLC: Ultra-högupplösande vätskekromatografi.

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

Tillägg 2

TESTMODELLER SOM INGÅR I DENNA TESTMETOD

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

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

SIT: hudirritationstest

RHE: rekonstruerad human epidermis

Tillägg 3

SPECIFIKA PROTOKOLLPARAMETRAR FÖR VARJE TESTMODELL SOM INGÅR I DENNA TESTMETOD

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

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

RT: rumstemperatur
DW: destillerat vatten
DPBS: Dulbeccos fosfatbuffrade saltlösning

Tillägg 4

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

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

(1) LLOQ: Undre kvantifieringsgräns definierad för att omfatta 1–2 % vävnadsviabilitet, dvs. 0,8 µg/ml.
(2) ULOQ: Övre kvantifieringsgräns, definierad för att vara minst dubbel så hög som den högsta förväntade koncentrationen av MTT-formazan i isopropanolextrakt från negativa kontroller, dvs. 200 µg/ml.

8) I del B ska följande kapitel läggas till:

"B.63 **SCREENINGTEST FÖR REPRODUKTIONS-/UTVECKLINGSTOXICITET**

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 421 (2016). OECD:s riktlinjer för kemikalietestning utvärderas med jämna mellanrum som en anpassning till den vetenskapliga utvecklingen. De ursprungliga riktlinjerna för screeningtest (421) antogs 1995, utifrån ett protokoll för ett preliminärt screeningtest för reproduktionstoxicitet som diskuterats vid två expertmöten, i London 1990 (1) och Tokyo 1992 (2).

2. Denna testmetod har uppdaterats med endpoints som är relevanta för hormonstörande ämnen, och detta är en uppföljning till den högprioriterade verksamhet som OECD inledde 1998 för att revidera befintliga testriktlinjer och ta fram nya riktlinjer för screening och testning av potentiella hormonstörande ämnen (3). OECD TG 407 (28-dagars toxicitetsstudie med upprepad oral dosering på gnagare, kapitel B.7 i denna bilaga) utökades till exempel 2008 med parametrar för att påvisa endokrin aktivitet hos testkemikalier. Syftet med uppdateringen av TG 421 var att inkludera några endpoints som är relevanta för hormonstörande ämnen i riktlinjerna för screeningtester där exponeringsperioderna omfattar några av de känsliga utvecklingsperioderna (pre- eller tidiga postnatalperioder).

3. De nya utvalda endpoints som är relevanta för hormonstörande ämnen och som också ingår i TG 443 (utökad enkelgenerationsstudie av reproduktionstoxicitet, motsvarande kapitel B.56 i denna bilaga) inkluderades i TG 421 på grundval av en förstudie som behandlade vetenskapliga och tekniska aspekter av deras inkluderande samt nödvändiga anpassningar av testets utformning för att möjliggöra ett inkluderande (4).

4. Denna testmetod är utformad för att generera begränsad information om en testkemikalies effekter på den hanliga och honliga fortplantningsförmågan, t.ex. beträffande könskörtlarnas funktion, parningsbeteende, befruktning, embryoutveckling och födsel. Den är inte ett alternativ till, eller en ersättning för, de befintliga testmetoderna B.31, B.34, B.35 eller B.56.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

5. Denna screeningtestmetod kan användas för att få en första information om vilka eventuella effekter en kemikalie har på reproduktion och/eller utveckling, antingen på ett tidigt stadium genom bedömning av kemikaliens toxikologiska egenskaper eller genom bedömning av kemikalien i sig. Studien kan också användas som en del av flera screeningtest för att ge en första bedömning av befintliga kemikalier för vilka ingen eller begränsad toxikologisk information finns tillgänglig, eller som en preliminär undersökning inför mer omfattande studier om reproduktion/utveckling eller när det av andra skäl anses relevant. Vid genomförande av studien bör man följa de vägledande principer och överväganden som beskrivs i OECD:s vägledning nr 19 om erkännande, bedömning och användning av kliniska tecken som humana endpoints för försöksdjur som används för säkerhetsbedömningar (5).

6. Denna testmetod ger ingen komplett information om alla aspekter av reproduktion och utveckling. Den är särskilt begränsad när det gäller att detektera postnatala uttryck av prenatal exponering, eller effekter som kan orsakas av postnatal exponering. Bland annat på grund av det ringa antalet försöksdjur i doseringsgrupperna, selektiviteten hos endpoints samt studiens begränsade varaktighet ger denna metod inga bevis för definitiva påståenden om utebliven effekt. Vid avsaknad av data från andra toxicitetstest om reproduktion/utveckling kan de positiva resultaten dessutom användas för en inledande riskbedömning och bidra till beslutsfattande gällande vilka övriga test som behövs och när.

7. Resultaten som erhölls genom de endokrinrelaterade parametrarna bör betraktas mot bakgrund av OECD:s begreppsram för provning och bedömning av hormonstörande ämnen (6). Den vidareutvecklade OECD TG 421 ingår i nivå 4 av begreppsramen som ett in vivo-test som genererar data om skadliga effekter för endokrinrelaterade endpoints. En endokrin signal kanske dock inte räcker för att påvisa att testkemikalien är ett hormonstörande ämne.

8. Vid test enligt denna metod används oral tillförsel av testkemikalien. Om tillförsel sker på annat sätt kan metoden behöva modifieras.

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

10. De definitioner som används finns i tillägg 1.

TESTPRINCIP

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

12. Honorna bör behandlas under hela studien. Detta inbegriper två veckor före parning (i syfte att täcka minst två kompletta ägglossningscykler), tiden fram till befruktning, dräktighetsperioden samt minst tretton dagar efter födsel, fram till dag för planerad avlivning.

13. Studiens längd, efter acklimatisering och bedömning av ägglossningscykeln före behandling, beror på honornas kondition och ligger på runt 63 dagar (minst 14 dagar före parning, (upp till) 14 dagars parning, 22 dagars dräktighetsperiod samt 13 dagars laktation).

14. Under administreringsperioden observeras djuren varje dag noggrant för tecken på toxicitet. Djur som dör eller avlivas under testet obduceras, och i slutet av testet avlivas överlevande djur och obduceras.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Val av djurart

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

Inhysning och utfodring

16. Alla förfaranden bör överensstämma med lokala normer för laboratoriedjurvård. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 °C (± 3 °). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och helst inte överstiga 70 % utom när rummet rengörs, och målet bör vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med ljusperioden 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodring kan konventionellt laboratoriefoder användas med obegränsad tillgång till dricksvatten. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie när den administreras genom denna metod.

17. Djuren bör inhysas i små grupper med individer av samma kön. Djuren kan inhysas individuellt om det är vetenskapligt motiverat. Vid grupplacering i bur bör inte fler än fem djur inhysas i en och samma bur. För parningsprocedurerna används burar som är lämpliga för ändamålet. Dräktiga honor ska hysas individuellt och förses med bomaterial. Digivande honor ska hysas individuellt med sina ungar.

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

Förberedelse av djuren

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

Beredning av doser

20. Det rekommenderas att testkemikalien administreras oralt såvida inte andra tillförselsätt anses mer lämpliga. Vid oral administrering ges testkemikalien i regel via sond, men testkemikalien kan även ges via fodret eller dricksvattnet.

21. Vid behov kan testkemikalien upplösas eller suspenderas i en lämplig vehikel. Det rekommenderas, när så är möjligt, att man först använder en vattenbaserad lösning/suspension följt av en lösning/emulsion i olja (t.ex. majsolja) och därefter eventuell lösning i andra vehiklar. För andra vehiklar än vatten bör vehikelns toxiska egenskaper vara kända. Testkemikaliens stabilitet och homogenitet i vehikeln bör bestämmas.

FÖRFARANDE

Djurens antal och kön

22. Det rekommenderas att varje grupp inledningsvis innehåller minst 10 hanar och 12–13 honor. Honornas ägglossningscykler undersöks före exponeringen, och individer som inte uppvisar typiska cykler på 4–5 dagar ska inte tas med i studien. Det är därför extra honor rekommenderas initialt så att varje grupp innehåller 10 honor. Förutom vid betydande toxiska effekter förväntas detta leda till minst 8 dräktiga honor per grupp, vilket i regel utgör det minsta acceptabla antalet dräktiga honor per grupp. Syftet med detta är att säkerställa ett tillräckligt antal dräktigheter och ungar för att möjliggöra en meningsfull utvärdering av testkemikaliens potential att påverka fertilitet, dräktighet och moderskaps- och dibeteende samt tillväxt och utveckling hos F_1-avkomman från befruktning till dag 13 post partum.

Dosering

23. I allmänhet bör minst tre doseringsgrupper och en kontrollgrupp användas. Dosnivåerna kan baseras på information från akuta toxicitetstester eller på resultat från studier med upprepad dosering. Med undantag av behandlingen med testkemikalien bör djuren i kontrollgruppen hanteras på exakt samma sätt som testgruppen. Om en vehikel används för att tillföra testkemikalien bör kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används.

24. Dosnivåerna bör väljas med hänsyn till eventuell toxicitetsdata och (toxikologisk) kinetisk data som finns tillgänglig. Hänsyn bör tas till eventuell skillnad i sensitivitet mellan dräktiga och icke-dräktiga djur. Den högsta nivån på dosen bör väljas i syfte att inducera toxiska verkningar, men inte leda till döden eller orsaka svåra lidanden. Därefter bör en fallande nivå på doserna väljas i syfte att påvisa en dosrelaterad respons och ingen påvisbar skadlig effekt vid den lägsta dosnivån (NOAEL). Två- till fyrfaldiga dosintervall är ofta optimala för de fallande doseringsnivåerna, och att lägga till en fjärde testgrupp är att föredra framför att använda mycket stora intervall (t.ex. mer än faktor 10) mellan doseringarna.

25. Vid observation av tecken på allmän toxicitet (t.ex. minskad kroppsvikt, effekter på lever, hjärta, lungor eller njurar) eller andra förändringar som kanske inte är toxiska reaktioner (t.ex. nedsatt födointag, leverförstoring) ska observerade effekter avseende endokrint känsliga endpoints tolkas med försiktighet.

Toleranstest

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

Administrering av doser

27. Försöksdjuren behandlas med testkemikalien dagligen under en vecka. När testkemikalien tillförs genom sondmatning bör detta ske i en engångsdos via magsond eller lämplig intubationskanyl. Den maximala vätskevolymen som kan administreras vid ett tillfälle är beroende av försöksdjurets storlek. Volymen får inte överstiga 1 ml per 100 g kroppsvikt, utom för vattenlösningar där volymen kan uppgå till 2 ml per 100 g kroppsvikt. Med undantag för irriterande eller korrosiva testkemikalier, som normalt kommer att visa stegrade verkningar vid högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom justering av koncentrationen för att säkerställa en konstant volym vid alla dosnivåer.

28. För kemikalier som tillförs via fodret eller dricksvattnet är det viktigt att säkerställa att kvantiteterna av den berörda testkemikalien inte påverkar normal närings- eller vattenbalans. När testkemikalien tillförs via kosten kan antingen en konstant foderkoncentration (PPM) eller en konstant doseringsnivå i förhållande till djurens kroppsvikt användas. Det alternativ som används ska anges. En testkemikalie som tillförs genom sondmatning bör ges vid samma tid varje dag och justeras minst varje vecka så att dosnivån hålls konstant i förhållande till djurens kroppsvikt.

Försöksschema

29. Behandlingen av båda könen bör påbörjas minst två veckor före parning, efter att de har acklimatiserats under minst fem dagar och efter att honorna har screenats för normala ägglossningscykler (under en tvåveckorsperiod före behandlingen). Studien bör planläggas så att bedömningen av ägglossningscykeln påbörjas kort efter att djuret ifråga blivit könsmoget. Detta kan variera något mellan olika råttstammar i olika laboratorier, t.ex. 10 veckors ålder för Sprague Dawley-råttor och 12 veckors ålder för Wistar-råttor. Moderdjur med ungar bör avlivas på dag 13 post partum, eller kort därefter. Dagen för födseln (dvs. efter avslutad förlossning) definieras som dag 0 post partum. Honor som inte uppvisar några tecken på att ha parat sig ska avlivas 24–26 dagar efter parningsperiodens sista dag. Tillförseln fortsätts för båda könen under parningsperioden. Hanar ska ges fortsatt behandling efter parningsperioden och minst till dess att en minimidoseringsperiod på totalt 28 dagar har uppnåtts. Därefter avlivas de eller hålls kvar och ges fortsatt behandling för en andra parning om så bedöms lämpligt.

30. Daglig dosering till dräktiga honor och moderdjur ska fortsätta genom hela dräktighetsperioden och minst till och med dag 13 post partum eller dagen före avlivningsdagen. När testkemikalien tillförs via inhalation eller applicering på huden ska doseringen fortsätta minst till och med dräktighetsdag 19, och doseringen bör återupptas så fort som möjligt efter födsel och inte senare än PND 4.

31. Ett diagram för försöksschemat finns i tillägg 2.

Parningsprocedur

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

Kullstorlek

33. På dag 4 efter födseln kan storleken på varje kull justeras genom att eliminera extra ungar genom slumpmässigt urval, så att det blir, så nära som möjligt, fyra eller fem ungar per kön per kull, beroende på den normala kullstorleken i den råttstam som använts. Blodprover ska tas på två av överskottsungarna och sparas för bestämning av T4-nivåer i serum. Selektiv eliminering av ungar, t.ex. utifrån kroppsvikt eller anogenitalt avstånd (AGD), är inte lämpligt. När antalet han- eller honungar inte medger fyra eller fem av varje kön per kull, är partiell anpassning acceptabelt (t.ex. sex hanar och fyra honor). Inga ungar ska elimineras när kullstorleken är mindre än det avsedda målet (8 eller 10 ungar/kull). Om det endast finns en överskottsunge utöver det avsedda målet ska endast en unge elimineras och användas för blodinsamling och eventuell bedömning av T4 i serum.

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

Observationer av levande djur

Kliniska observationer

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

Kroppsvikt samt foder- och vattenkonsumtion

36. Hanar och honor ska vägas på doseringens första dag, minst en gång i veckan därefter samt vid testets slut. Under dräktighetstiden ska honorna vägas på dag 0, 7, 14 och 20 samt inom 24 timmar efter födseln (dag 0 eller 1 post partum) och åtminstone på dag 4 och 13 post partum. Dessa observationer bör rapporteras individuellt för varje vuxet djur.

37. Under tiden före parning, dräktighetsperiod samt laktation ska foderintaget mätas åtminstone en gång i veckan. Det är inte obligatoriskt att mäta foderintaget under parningsperioden. Om testkemikalien tillförs via dricksvattnet bör även vattenkonsumtionen mätas under nämnda perioder.

Ägglossningscykler

38. Ägglossningscyklerna bör övervakas innan behandlingen startar i syfte att välja ut honor med regelbundna cykler till försöket se punkt 22). Även vaginala utstryk bör övervakas dagligen från behandlingens början till dess att parning bevisligen skett. Om det vid doseringens början föreligger misstankar om akuta stresseffekter som kan störa ägglossningscyklerna kan laboratoriet exponera försöksdjuren under två veckor och därefter samla in vaginala utstryk dagligen i syfte att övervaka ägglossningscyklerna under minst två veckor före parning, med fortsatt övervakning under parningsperioden fram till dess att parning bevisligen skett. När celler från vagina eller livmoderhals samlas in bör försiktighet iakttas för att undvika skador på slemhinnan, eftersom sådana kan framkalla pseudodräktighet (7) (8).

Parametrar för avkomman

39. Dräktighetsperioden bör registreras och beräknas från dräktighetsdag 0. Varje kull ska undersökas snarast möjligt efter nedkomsten i syfte att fastställa antal och kön för ungar, dödfödda, levande födda, småväxta ungar (avsevärt mindre än motsvarande kontrollungar) samt eventuella större avvikelser.

40. Levande ungar ska räknas och könsbestämmas, och kullarna ska vägas inom 24 timmar efter födseln (dag 0 eller 1 post partum) samt åtminstone på dag 4 och 13 post partum. Utöver de observationer som beskrivs i punkt 35 ska allt onormalt beteende hos ungarna registreras.

41. AGD på varje unge ska mätas på samma dag efter födseln, någon gång mellan PND 0 och PND 4. Ungarnas kroppsvikt bör samlas in under dagen för AGD-mätningen, och AGD bör normaliseras till ett mått på ungarnas storlek, företrädesvis kubikroten ur kroppsvikten (9). Antal bröstvårtor/vårtgårdar på hanungarna ska räknas på PND 12 eller 13 enligt rekommendationerna i OECD GD 151 (10).

Klinisk biokemi

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

— från minst två ungar per kull på dag 4 efter födseln, om antalet ungar så tillåter (se punkterna 33 och 34),

— från alla moderdjur och minst två ungar per kull när försöket avslutas på dag 13, och

— från alla vuxna hanar vid försökets slut.

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

43. Följande faktorer kan påverka variationen och de absoluta koncentrationerna för hormonbestämningarna:

— Tidpunkt för avlivningen beroende på hormonkoncentrationernas dygnsvariation.

— Avlivningsmetod för att undvika onödig stress hos djuren som kan påverka hormonkoncentrationerna.

— Testsatser för hormonbestämningar som kan skilja sig åt genom sina standardkurvor.

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

Patologi

Obduktion

45. Vid avlivning eller om djur dör under pågående test ska vuxna djur undersökas makroskopiskt med avseende på avvikelser eller patologiska förändringar. Särskild uppmärksamhet bör ägnas åt organen i reproduktionssystemet. Antal implantationsställen ska registreras. Vaginala utstryk ska undersökas på morgonen samma dag som obduktionen äger rum för att fastställa ägglossningscykelns skede och möjliggöra korrelation med äggstockarnas histopatologi.

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

47. Döda ungar och ungar som avlivas på dag 13 post partum, eller kort därefter, ska undersökas noga åtminstone externt för grova avvikelser. Särskild uppmärksamhet bör fästas vid de yttre reproduktionsorganen, som ska undersökas för tecken på avvikande utveckling. På dag 13 ska sköldkörteln från 1 hanunge och 1 honunge per kull bevaras.

48. Äggstockar, testiklar, accessoriska könsorgan (livmoder och livmoderhals, bitestiklar, sädesblåsor plus koaguleringskörtlar) och sköldkörtlar från samtliga vuxna försöksdjur, inklusive alla organ som uppvisar skador vid makroskopisk undersökning, ska bevaras. Fixering med formalin rekommenderas inte för rutinundersökning av testiklar och bitestiklar. I stället bör Bouins lösning eller modifierat fixeringsmedel enligt Davidson användas för dessa vävnader (11). Tunica albuginea kan punkteras försiktigt och ytligt med en nål på organets båda poler för en snabb inträngning av fixeringsmedlet.

Histopatologi

49. En detaljerad histologisk undersökning ska genomföras på äggstockar, testiklar och bitestiklar (särskild uppmärksamhet bör fästas vid spermatogenesens stadier samt vid histopatologin hos den interstitala cellstrukturen i testiklarna) på försöksdjuren i den högsta doseringsgruppen samt på djuren i kontrollgruppen. Övriga organ som bevarats inklusive sköldkörtlar från ungar och vuxna djur kan undersökas om det behövs. Sköldkörtelns vikt kan bestämmas efter fixering. Putsning ska också göras väldigt försiktigt, och först efter fixeringen för att undvika vävnadsskador. Vävnadsskador kan påverka den histopatologiska analysen negativt. När förändringar observeras i gruppen med högst dosering kan undersökningen utökas till att inkludera djur från andra doseringsgrupper. Vägledningen om histopatologi (11) omfattar detaljerad information om dissektion, fixering, sektionering och histopatologi av endokrina vävnader.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

50. Data bör rapporteras individuellt per djur. Alla data ska sammanställas i en tabell. Tabellen ska för varje testgrupp visa antalet djur vid testets början, antalet djur som under testets gång har dött eller avlivats av humana skäl, tidpunkten för alla dödsfall eller humana avlivningar, antalet fertila djur, antalet dräktiga honor, antalet djur som uppvisar tecken på toxicitet, en beskrivning av de toxicitetstecken som har observerats (inklusive tidpunkt då dessa först upptäcktes samt verkningarnas varaktighet och allvarlighetsgrad), typerna av histopatologiska förändringar samt all annan relevant data om kullarna. I tillägg 3 finns ett tabellformat som har visat sig vara mycket användbart för att redovisa reproduktiva effekter och utvecklingseffekter.

51. På grund av denna studies begränsade omfattning har statistiska analyser om ”signifikans” begränsat värde för flera endpoints, särskilt reproduktiva sådana. Om statistiska analyser används ska en lämplig metod för distributionen av den valda variabeln väljas ut innan testet påbörjas. Statistiska analyser av AGD och bröstvårteretention ska baseras på data för varje individuell unge med beaktande av effekter på kullen ifråga. När så är lämpligt ska kullen utgöra analysenheten. Statistiska analyser av ungarnas kroppsvikt ska baseras på data för varje individuell unge med beaktande av kullstorlek. På grund av den ringa gruppstorleken kan det också vara värdefullt att använda historiska kontrolldata (t.ex. för kullstorlek), om sådana finns, som ett stöd för tolkning av studien.

Utvärdering av resultaten

52. Resultaten bör utvärderas i termer av de observerade effekterna, inklusive obduktion och mikroskopiska iakttagelser. Utvärderingen ska omfatta förhållandet mellan testkemikaliedosen och närvaron eller frånvaron av samt incidensen och allvarlighetsgraden av avvikelser, inbegripet grova skador, identifierade målorgan, infertilitet, kliniska avvikelser, verkningar på reproduktionsförmågan och kullen, avvikelser rörande kroppsvikt, verkningar på mortaliteten samt alla andra toxiska effekter.

53. Eftersom hanarna endast behandlas under en kort tid bör histopatologin hos testiklar och bitestiklar bedömas tillsammans med fertilitetsdata vid uppskattningen av effekter på reproduktionsförmågan hos hanar. Historiska kontrolldata om reproduktion/utveckling (t.ex. kullstorlek, AGD, bröstvårteretention, T4-nivåer i serum), om sådana finns, kan vara användbara vid tolkningen av studien.

54. Som kvalitetskontroll föreslås att historiska kontrolldata samlas in och att man för numeriska data beräknar variationskoefficienter, särskilt för de parametrar som kopplas till påvisande av hormonstörande ämnen. Dessa data kan sedan användas för jämförelseändamål när aktuella studier utvärderas.

Testrapport

55. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

— Källa, satsnummer, sista förbrukningsdag om detta anges.

— Testkemikaliens stabilitet, om den är känd.

Monokomponentämne:

— fysikaliskt tillstånd, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.

Multikomponentämne, UVCB-ämnen och blandningar:

— karakteriseras så långt som möjligt genom beståndsdelarnas kemiska identitet (se ovan), kvantitativa förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

Vehikel (i förekommande fall):

— Motivering för val av vehikel om annan än vatten.

Försöksdjur:

— Art och stam som används.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Ursprung, inhysning, foder osv.

— Djurens individuella vikt vid testets början.

— Motivering för val av art, om inte råtta.

Testbetingelser:

— Grund för valet av dosnivå.

— Uppgifter om testkemikaliens sammansättning/foderberedning, uppnådd koncentration, preparatets stabilitet och homogenitet.

— Uppgifter om administreringen av testkemikalien.

— Omvandling från fodrets/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (ppm) till faktisk dos (mg/kg kroppsvikt/dag), i förekommande fall.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

— Detaljerad beskrivning av slumpmässighetsförfaranden för att välja ut ungar för avlivning, om avlivning skett.

Resultat:

— Kroppsvikt/kroppsviktsförändringar.

— Foderkonsumtion och vattenkonsumtion, i förekommande fall.

— Uppgifter om toxisk reaktion uppdelade efter kön och dos, inbegripet fertilitet, dräktighet och avkommans livsduglighet.

— Dräktighetsperiodens längd.

— Toxiska eller andra verkningar på reproduktion, avkomma, postnatal tillväxt och dylikt.

— Art, allvarlighetsgrad och varaktighet för kliniska observationer (huruvida de är reversibla eller ej).

— Antal vuxna honor med normal eller onormal ägglossningscykel samt cykelns varaktighet.

— Antalet levande födda och postimplantationsförlust.

— Uppgifter om ungarnas kroppsvikt.

— AGD på samtliga ungar (och deras kroppsvikt på dagen för mätning av AGD).

— Bröstvårteretention hos hanungar.

— Nivåer av tyreoideahormoner hos 13 dagar gamla ungar och vuxna hanar (samt på moderdjur och 4 dagar gamla ungar om detta har uppmätts).

— Antal ungar med lätt synliga avvikelser, generell bedömning av yttre könsorgan och antal småväxta ungar.

— Tidpunkt för dödsfall under testet eller huruvida djuren överlevde fram till avslutningen.

— Antal implantationer, kullstorlek och kullens vikt vid tiden för registrering.

— Kroppsvikt vid avlivningen samt absolut och relativ organvikt för föräldradjuren.

— Obduktionsfynd.

— En detaljerad redogörelse av alla histopatologiska fynd.

— Absorptionsdata (om sådana är kända).

— Statistisk bearbetning av resultaten, i tillämpliga fall.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

Tolkning av resultaten

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

LITTERATURHÄNVISNINGAR

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Tillgängligt på förfrågan hos Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27–29 oktober, 1992. Tillgängligt på förfrågan hos Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Tillgängligt på förfrågan hos Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 217, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment nr 19, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(6) OECD (2011). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 150, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

(8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, i Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 151, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 106, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 43, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

Tillägg 1

DEFINITIONER (SE ÄVEN OECD GD 150 (6))

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

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

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

Antityreoid aktivitet är förmågan hos en kemikalie att undertrycka verkan av ett naturligt tyreoideahormon (t.ex. $T_{3)}$ hos ett däggdjur.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

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

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

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

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

Nedsatt fertilitet innebär störningar i fortplantningsförmågan hos hanen eller honan.

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

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

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

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

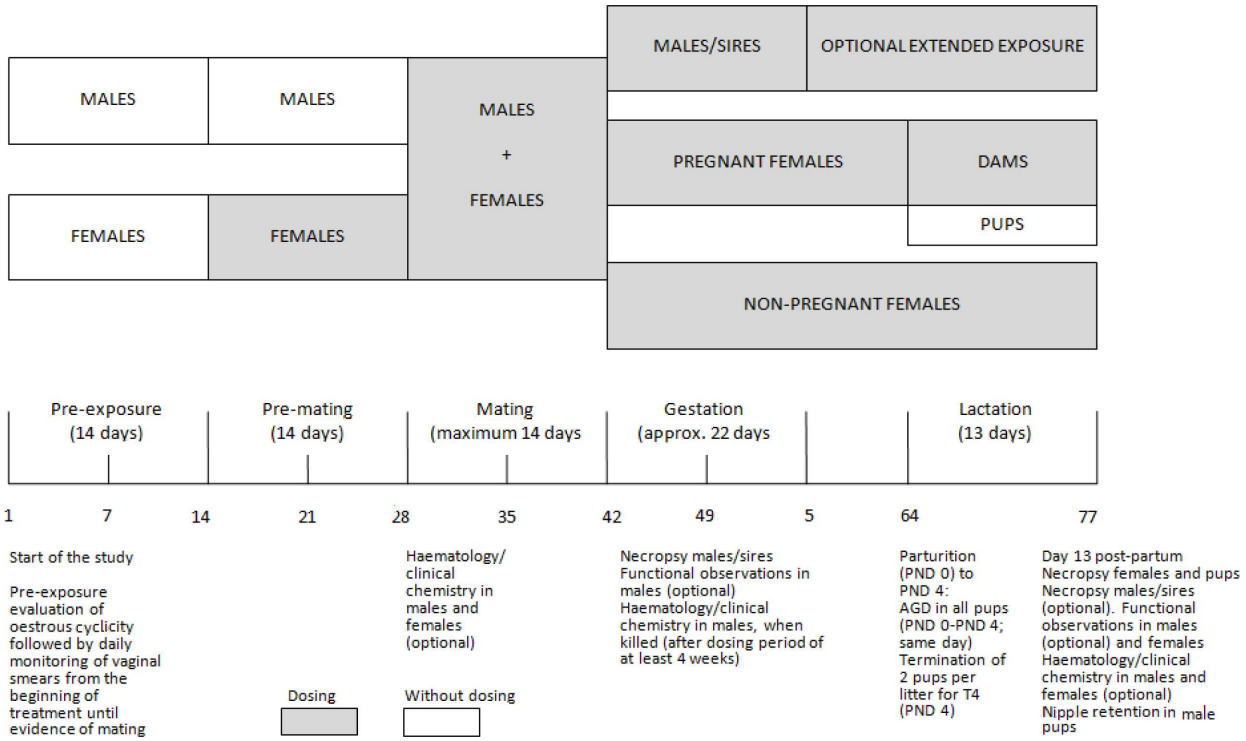
Testkemikalie: varje ämne eller blandning som testas med denna testmetod.

Tyreoid aktivitet är förmågan hos en kemikalie att agera som ett naturligt tyreoideahormon (t.ex. $T_{3)}$ hos ett däggdjur.

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

Tillägg 2

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



Tillägg 3

SAMMANFATTNING I TABELLFORM AV EFFEKTER PÅ REPRODUKTION/UTVECKLING

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

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

([1]) Parningsperiodens sista dag

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

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 422 (2016). OECD:s riktlinjer för kemikalietestning utvärderas med jämna mellanrum för att anpassas till den vetenskapliga utvecklingen. De ursprungliga riktlinjerna för screeningtest 422 antogs 1996 utifrån ett protokoll för upprepad dosering kombinerat med reproduktions-/utvecklingstoxicitet som diskuterats vid två expertmöten, i London 1990 (1) och i Tokyo 1992 (2).

2. I denna testmetod kombineras dels en screeningdel för reproduktions-/utvecklingstoxicitet som bygger på erfarenheter från medlemsländer som använt sig av den ursprungliga metoden på befintliga högvolymkemikalier och som gjort explorativa tester med positiva kontrollämnen (3) (4), dels en del som avser toxicitet vid upprepad dosering, i enlighet med OECD:s testriktlinje 407 (28-dagars toxicitetsstudie med upprepad oral dosering på gnagare, som motsvaras av kapitel B.7 i denna bilaga).

3. Denna testmetod har uppdaterats med endpoints som är relevanta för hormonstörande ämnen, och detta är en uppföljning till den högprioriterade verksamhet som OECD inledde 1998 för att revidera befintliga testriktlinjer och ta fram nya riktlinjer för screening och testning av potentiella hormonstörande ämnen (5). Inom ramen för denna verksamhet utökades TG 407 (motsvaras av kapitel B.7 i denna bilaga) 2008 med parametrar för att påvisa endokrin aktivitet hos testkemikalier. Syftet med uppdateringen av TG 422 var att inkludera några endpoints som är relevanta för hormonstörande ämnen i riktlinjerna för screeningtester där exponeringsperioderna omfattar några av de känsliga utvecklingsperioderna (pre- eller tidiga postnatalperioder).

4. De nya utvalda endpoints som är relevanta för hormonstörande ämnen och som också ingår i TG 443 (utökad enkelgenerationsstudie av reproduktionstoxicitet, motsvarande kapitel B.56 i denna bilaga) inkluderades i TG 422 på grundval av en förstudie som behandlade vetenskapliga och tekniska aspekter av deras inkluderande samt nödvändiga anpassningar av testets utformning för att möjliggöra ett inkluderande (6).

5. Denna testmetod är utformad för att generera begränsad information om en testkemikalies effekter på den hanliga och honliga fortplantningsförmågan, t.ex. beträffande könskörtlarnas funktion, parningsbeteende, befruktning, embryoutveckling och födsel. Den är inte ett alternativ till, eller en ersättning för, de befintliga testmetoderna B.31, B.34, B.35 eller B.56.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

6. Vid bedömningen och utvärderingen av de toxiska egenskaperna hos en testkemikalie kan bestämningen av toxicitet med upprepad oral dosering genomföras efter att inledande information om toxicitet har erhållits genom testning av akut toxicitet. Denna studie ger information om eventuella troliga hälsorisker vid upprepad exponering under en relativt begränsad tidsperiod. Metoden innefattar den grundläggande toxicitetsstudien med upprepad dosering som kan användas för kemikalier för vilka en 90-dagarsstudie inte är motiverad (t.ex. när produktionsvolymen inte överskrider vissa gränser) eller som en inledning till en långtidsstudie. Vid genomförandet av studien bör man alltid följa de vägledande principer och överväganden som beskrivs i OECD:s vägledningsdokument 19 om erkännande, bedömning och användning av kliniska tecken som humana endpoints för försöksdjur som används för säkerhetsbedömningar (7).

7. Metoden består dessutom av ett screeningtest för reproduktions-/utvecklingstoxicitet och kan därför även användas för att ge preliminär information om möjliga effekter på fortplantningsförmågan hos hanar och honor, t.ex. beträffande könskörtlarnas funktion, parningsbeteende, befruktning, embryoutveckling och förlossning, antingen för en tidig bedömning av testkemikaliers toxikologiska egenskaper eller för bedömning av farliga testkemikalier. Denna testmetod ger ingen komplett information om alla aspekter av reproduktion och utveckling. Metoden ger endast begränsad möjlighet att detektera postnatala uttryck på prenatal exponering, eller effekter som kan ha orsakats av postnatal exponering. Bland annat på grund av selektiviteten hos endpoints samt studiens begränsade varaktighet ger denna metod inga bevis eller definitiva svar om utebliven effekt på reproduktion/utveckling. Vid avsaknad av data från andra toxicitetstest om reproduktion/utveckling kan de positiva resultaten dessutom användas för en inledande riskbedömning och bidra till beslutsfattande gällande vilka övriga test som behövs och när.

8. Resultaten som erhölls genom de endokrinrelaterade parametrarna bör betraktas mot bakgrund av OECD:s begreppsram för provning och bedömning av hormonstörande ämnen (8). Den vidareutvecklade OECD TG 422 ingår i nivå 4 av begreppsramen som ett in vivo-test som genererar data om skadliga effekter för endokrinrelaterade endpoints. En endokrin signal kanske dock inte räcker för att påvisa att testkemikalien är ett hormonstörande ämne.

9. Denna metod lägger även vikt vid neurologiska effekter som en särskild endpoint samt behovet av noggranna kliniska observationer av djuren för att erhålla mesta möjliga information. Metoden ska identifiera kemikalier med eventuell neurotoxisk verkan, vilket kan motivera mer ingående undersökningar av den aspekten. Denna metod kan dessutom ge basindikationer på immunologiska effekter.

10. Med tanke på avsaknaden av data från andra systemtest om reproduktions/utvecklingstoxicitet, neurotoxicitet och/eller immuntoxicitet kan de positiva resultaten användas för en inledande riskbedömning och bidra till beslutsfattande gällande vilka övriga test som behövs och när. Detta test är särskilt användbart som en del av SIDS (OECD Screening Information Data Set) för att bedöma befintliga kemikalier som det finns ringa eller ingen toxikologisk information om, och det kan användas som ett alternativ till genomförande av två separata test: ett för toxicitet vid upprepad dosering (OCD TG 407, motsvaras av kapitel B.7 i denna bilaga) respektive ett för reproduktions-/utvecklingstoxicitet (OECD TG 421, motsvaras av kapitel B.63 i denna bilaga). Det kan även användas som en preliminär undersökning inför mer omfattande studier om reproduktion/utveckling, eller av andra anledningar.

11. Den allmänna uppfattningen är att det finns skillnader i sensitivitet mellan dräktiga och icke-dräktiga djur. I kombinerade tester kan det därför vara mer komplicerat att fastställa dosnivåer som är korrekta för bedömning av både generell systemtoxicitet och specifik reproduktions-/utvecklingstoxicitet än vad det är i individuella test som utförs separat. Det kan därför vara svårare att tolka testresultaten vad gäller allmän systemtoxicitet än vid genomförande av separata studier med upprepade doser, särskilt när parametrarna för serum och histopatologi inte bedöms samtidigt i studien. På grund av denna tekniska komplexitet krävs det stor erfarenhet av toxicitetstest för att utföra detta kombinerade screeningtest. Å andra sidan kan ett kombinerat test, förutom att det kräver färre försöksdjur, ge bättre möjligheter att skilja direkta effekter på reproduktion/utveckling från effekter som beror på andra (systemiska) effekter.

12. I det här testet är doseringsperioden längre än i en konventionell 28-dagars studie med upprepade doser. Det kräver dock färre djur av varje kön per grupp jämfört med när en konventionell 28-dagars studie med upprepade doser genomförs som ett komplement till ett screeningtest för reproduktions-/utvecklingstoxicitet.

13. Vid test enligt denna metod används oral tillförsel av testkemikalien. Om tillförsel sker på annat sätt kan metoden behöva modifieras.

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

15. De definitioner som används finns i tillägg 1.

TESTPRINCIP

16. Testkemikalien tillförs i graderade doser till flera grupper av hanar och honor. Hanarna ska behandlas i minst fyra veckor, inbegripet dagen före den planerade avlivningen (detta inkluderar minst två veckor före parning, under parningsperioden och ungefär två veckor efter parning). Eftersom hanarna endast behandlas under en begränsad period före parning kan fertilitet inte anses utgöra en särskilt känslig indikator för testikeltoxicitet. Därför krävs en detaljerad histologisk undersökning av testiklarna. En två veckors doseringsperiod före parning i kombination med

efterföljande observationer av parning/fertilitet och en sammanlagd doseringsperiod på minst fyra veckor, följt av en ingående histopatologisk analys av hanarnas könskörtlar, anses vara tillräckligt för att påvisa flertalet effekter på hanarnas fertilitet och spermatogenes.

17. Honorna bör behandlas under hela studien. Detta inbegriper två veckor före parning (i syfte att täcka minst två kompletta ägglossningscykler), tiden fram till befruktning, dräktighetsperioden samt minst tretton dagar efter födsel, fram till dag för planerad avlivning.

18. Studiens längd, efter acklimatisering och bedömning av ägglossningscykeln före behandling, beror på honornas kondition och ligger på runt 63 dagar (minst 14 dagar före parning, (upp till) 14 dagars parning, 22 dagars dräktighetsperiod samt 13 dagars laktation).

19. Under administreringsperioden observeras djuren varje dag noggrant för tecken på toxicitet. Djur som dör eller avlivas under testet obduceras, och i slutet av testet avlivas överlevande djur och obduceras.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Val av djurart

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

Inhysning och utfodring

21. Alla förfaranden bör överensstämma med lokala normer för laboratoriedjurvård. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 °C (± 3 °). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Belysningen bör vara artificiell med ljusperioden 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodring kan konventionellt laboratoriefoder användas med obegränsad tillgång till dricksvatten. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie när den administreras genom denna metod.

22. Djuren bör inhysas i små grupper med individer av samma kön. Djuren kan inhysas individuellt om det är vetenskapligt motiverat. Vid grupplacering i bur bör inte fler än fem djur inhysas i en och samma bur. För parningsprocedurerna används burar som är lämpliga för ändamålet. Dräktiga honor ska hysas individuellt och förses med bomaterial. Digivande honor ska hysas individuellt med sina ungar.

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

Förberedelse av djuren

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

Beredning av doser

25. Det rekommenderas att testkemikalien administreras oralt såvida inte andra tillförselsätt anses mer lämpliga. Vid oral administrering ges testkemikalien i regel via sond, men testkemikalien kan även ges via fodret eller via dricksvattnet.

26. Vid behov kan testkemikalien upplösas eller suspenderas i en lämplig vehikel. Det rekommenderas att man, när så är möjligt, i första hand använder en vattenbaserad lösning/suspension, i andra hand en lösning/suspension i olja (t.ex. majsolja) och i tredje hand en lösning i andra vehiklar. För andra vehiklar än vatten bör vehikelns toxiska egenskaper vara kända. Testkemikaliens stabilitet och homogenitet i vehikeln bör bestämmas.

FÖRFARANDE

Djurens antal och kön

27. Det rekommenderas att varje grupp inledningsvis innehåller minst 10 hanar och 12–13 honor. Honornas äggloss-ningscykler undersöks före exponeringen, och individer som inte uppvisar typiska cykler på 4–5 dagar ska inte tas med i studien. Det är därför extra honor rekommenderas initialt så att varje grupp innehåller 10 honor. Förutom vid betydande toxiska effekter förväntas detta leda till minst 8 dräktiga honor per grupp, vilket i regel utgör det minsta acceptabla antalet dräktiga honor per grupp. Syftet med detta är att säkerställa ett tillräckligt antal dräktigheter och ungar för att möjliggöra en meningsfull utvärdering av testkemikaliens potential att påverka fertilitet, dräktighet och moderskaps- och dibeteende samt tillväxt och utveckling hos F_1-avkomman från befruktning till dag 13 post partum. Om avlivningar är inplanerade under testets gång bör antalet djur ökas med det antal djur som enligt planeringen ska avlivas innan testet avslutas. En extra satellitgrupp på fem djur per kön i kontroll- respektive toppdosgruppen bör övervägas för observation beträffande reversibilitet, persistens eller fördröjda toxiska verkningar under minst 14 dagar efter behandlingen. Djuren i satellitgrupperna ska inte paras och används därför inte för bedömning av reproduk-tions-/utvecklingstoxicitet.

Dosering

28. I allmänhet bör minst tre doseringsgrupper och en kontrollgrupp användas. Om det inte finns några lämpliga data tillgängliga kan en preliminär undersökning (djur av samma stam och ursprung) utföras för att underlätta bestäm-ningen av de doser som ska användas. Med undantag av behandlingen med testkemikalien bör djuren i kontroll-gruppen hanteras på exakt samma sätt som testgruppen. Om en vehikel används för att tillföra testkemikalien bör kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används.

29. Dosnivåerna bör väljas med hänsyn till eventuell toxicitetsdata och (toxikologisk) kinetisk data som finns tillgänglig. Hänsyn bör tas till eventuell skillnad i sensitivitet mellan dräktiga och icke-dräktiga djur. Den högsta doseringsnivån bör väljas i syfte att den ska inducera toxiska verkningar, men inte leda till döden eller orsaka uppenbart lidande. Därefter bör en fallande nivå på doserna väljas i syfte att påvisa eventuella dosrelaterade responser och frånvaro av skadliga effekter vid den lägsta dosnivån. Det är ofta optimalt med två till fyra intervall, och tillägg av en fjärde testgrupp är ofta att föredra framför användning av mycket breda intervall (exempelvis mer än faktorn 10) mellan doseringsnivåerna.

30. Vid observation av tecken på allmän toxicitet (t.ex. minskad kroppsvikt, effekter på lever, hjärta, lungor eller njurar) eller andra förändringar som kanske inte är toxiska reaktioner (t.ex. nedsatt födointag, leverförstoring) ska observe-rade effekter avseende endokrint känsliga endpoints tolkas med försiktighet.

Toleranstest

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

Administrering av doser

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

irriterande eller korrosiva testkemikalier, som normalt kommer att visa stegrade verkningar vid högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom justering av koncentrationen för att säkerställa en konstant volym vid alla dosnivåer.

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

Försöksschema

34. Behandlingen av båda könen bör påbörjas två veckor före parning, efter att de har acklimatiserats under minst fem dagar och efter att honorna har screenats för normala ägglossningscykler (under en tvåveckorsperiod före behandlingen). Studien bör planläggas så att bedömningen av ägglossningscykeln påbörjas kort efter att djuret ifråga blivit könsmoget. Detta kan variera något mellan olika råttstammar i olika laboratorier, t.ex. 10 veckors ålder för Sprague Dawley-råttor och 12 veckors ålder för Wistar-råttor. Moderdjur med ungar bör avlivas på dag 13 post partum, eller kort därefter. Moderdjur och ungar behöver inte nödvändigtvis avlivas på samma dag, om detta omöjliggör för moderdjuret att fasta dagen före blodprovstagningen (om fastande är att föredra). Dagen för födseln (dvs. efter avslutad förlossning) definieras som dag 0 post partum. Honor som inte uppvisar några tecken på att ha parat sig ska avlivas 24–26 dagar efter parningsperiodens sista dag. Tillförseln fortsätts för båda könen under den två veckor långa parningsperioden. Hanar ska ges fortsatt behandling efter parningsperioden och minst till dess att en minimidoseringsperiod på totalt 28 dagar har uppnåtts. Därefter avlivas de eller hålls kvar och ges fortsatt behandling för en andra parning om så bedöms lämpligt.

35. Daglig dosering till dräktiga honor och moderdjur ska fortsätta genom hela dräktighetsperioden och minst till och med dag 13 post partum eller dagen före avlivningsdagen. När testkemikalien tillförs via inhalation eller applicering på huden ska doseringen fortsätta minst till och med dräktighetsdag 19, och doseringen bör återupptas så fort som möjligt efter födseln och inte senare än PND 4.

36. Djur i satellitgrupper för vilka uppföljande observationer planeras, om sådana är inkluderade i testet, ska inte paras. Dessa djur bör hållas i ytterligare minst 14 dagar efter den första planerade avlivningen av moderdjur, utan behandling för att fördröjda eller kvarstående toxiska effekter eller återhämtning från toxiska effekter ska kunna upptäckas.

37. Ett diagram för försöksschemat finns i tillägg 2.

Ägglossningscykler

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

Parningsprocedur

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

Kullstorlek

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

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

Observationer

42. Allmänna kliniska observationer bör göras minst en gång per dag, helst vid samma tidpunkt varje dag med hänsyn till maximalt förväntade effekter efter doseringen. Djurens hälsotillstånd bör registreras. Minst två gånger dagligen bör alla djur observeras beträffande morbiditet och mortalitet.

43. En gång före den första exponeringen (för att möjliggöra individuella jämförelser), och därefter minst en gång per vecka, ska ingående kliniska observationer göras av samtliga föräldradjur. Dessa observationer bör göras utanför buren på en ”standardarena” och helst vid samma tidpunkt varje gång. Observationerna ska registreras noggrant, helst med hjälp av ett poängsystem som definierats utförligt av testlaboratoriet. Åtgärder bör vidtas för att säkerställa att variationen i testbetingelser är minimal och att observationerna helst utförs av personer som inte känner till behandlingen. Observationerna bör omfatta, men inte begränsas till, förändringar i hud, päls, ögon, slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (t.ex. tårflöde, piloerektion, pupillstorlek, ovanligt andningsmönster). Förändringar i gång, hållning och reaktion på hantering liksom eventuella kramper eller spasmer, stereotypier (t.ex. överdrivet putsande, repetitivt cirklande), svåra eller förlängda förlossningar eller bisarrt beteende (t.ex. självstympning, baklängesgång) ska också registreras (10).

44. Vid ett tillfälle under studiens gång ska en bedömning göras av djurens sinnesreaktioner på olika sorters stimuli (t.ex. auditiva, visuella och proprioceptiva stimuli) (8) (9) (11), samt av djurens gripstyrka (12) och motorisk aktivitet (13), och för denna bedömning ska fem hanar och fem honor väljas ut slumpmässigt ur varje grupp. Ytterligare uppgifter om de procedurer som kan följas finns i respektive hänvisningar. Dock kan även andra procedurer än de som hänvisas till användas. När det gäller hanarna ska nämnda funktionsobservationer göras mot slutet av doseringsperioden, kort före planerad avlivning men före hematologisk eller klinisk blodprovstagning (se punkterna 53–56 inklusive fotnot 1). Honorna bör befinna sig i ett liknande fysiologiskt tillstånd vid tidpunkten för dessa funktionstester, vilka företrädesvis ska utföras en gång under den sista laktationsveckan (t.ex. LD 6–13), kort före planerad avlivning. Eventuell separation av moderdjur och deras ungar ska minimeras så långt det är möjligt.

45. Funktionsobservationer som görs en gång mot slutet av studien kan utelämnas om studien utförs som inledning till en subkronisk (90-dagars) eller en långtidsstudie. I så fall bör funktionsobservationerna i stället tas med i nämnda uppföljningsstudie. Å andra sidan kan tillgången på data om funktionsobservationer från studien med upprepad dosering öka möjligheten att välja dosnivåer för en efterföljande subkronisk studie eller långtidsstudie.

46. I undantagsfall kan funktionsobservationer utlämnas för grupper som annars skulle uppvisa tecken på toxicitet i sådan utsträckning att det väsentligen skulle påverka funktionstestets prestanda.

47. Dräktighetsperioden bör registreras och beräknas från dräktighetsdag 0. Varje kull ska undersökas snarast möjligt efter nedkomsten i syfte att fastställa antal och kön för ungar, dödfödda, levande födda, småväxta djur (ungar som är avsevärt mindre än motsvarande kontrollungar) samt eventuella större avvikelser.

48. Levande ungar ska räknas och könsbestämmas, och kullarna ska vägas inom 24 timmar efter födseln (dag 0 eller dag 1 post partum) samt åtminstone på dag 4 och 13 post partum. Utöver observationerna av föräldradjuren (se punkterna 43 och 44) ska allt onormalt beteende hos ungarna registreras.

49. AGD på varje unge ska mätas på samma dag efter födseln, någon gång mellan PND 0 och PND 4. Ungarnas kroppsvikt bör samlas in under dagen för AGD-mätningen, och AGD bör normaliseras till ett mått på ungarnas storlek, företrädesvis kubikroten ur kroppsvikten (14). Antal bröstvårtor/vårtgårdar på hanungarna ska räknas på PND 12 eller 13 enligt rekommendationerna i OECD GD 151 (15).

Kroppsvikt och foder-/vattenkonsumtion

50. Hanar och honor ska vägas på behandlingens första dag, minst en gång i veckan därefter samt vid testets slut. Under dräktighetstiden ska honorna vägas på dag 0, 7, 14 och 20 samt inom 24 timmar efter födseln (dag 0 eller 1 post partum) och åtminstone på dag 4 och 13 post partum. Dessa observationer bör rapporteras individuellt för varje vuxet djur.

51. Under tiden före parning, dräktighetsperiod samt laktation ska foderintaget mätas åtminstone en gång i veckan. Det är inte obligatoriskt att mäta foderintaget under parningsperioden. Om testkemikalien tillförs via dricksvattnet bör även vattenkonsumtionen mätas under nämnda perioder.

Hematologi

52. Vid ett tillfälle under studiens gång ska följande hematologiska undersökningar göras på fem hanar och fem honor som väljs ut slumpmässigt ur varje grupp: hematokrit, hemoglobinkoncentrationer, räkning av röda blodkroppar, retikulocyter, total- och differentialräkning av vita blodkroppar, blodplättsräkning samt ett mått på koaguleringstid och koaguleringsförmåga. Andra bestämningar som bör utföras, om testkemikalien eller dess förmodade metaboliteter har eller misstänks ha oxiderande egenskaper, inkluderar methemoglobinkoncentration och Heinz-kroppar.

53. Blodproven ska tas från ett angivet ställe. Honorna bör befinna sig i ett liknande fysiologiskt tillstånd under provtagningen. För att undvika praktiska problem relaterade till skillnad i dräktighetslängd kan blodprovstagningen utföras i slutet av perioden före parning i stället för strax innan, eller i samband med, avlivningen av djuren. Blodproven på hanarna ska helst tas strax innan, eller i samband med, avlivningen av djuren. Blodproven på hanarna kan också tas i slutet av perioden före parning om denna tidpunkt har föredragits för honorna.

54. Alla blodprov ska förvaras under lämpliga förhållanden.

Klinisk biokemi

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

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

— från minst två ungar per kull på dag 4 efter födseln, om antalet ungar så tillåter (se punkterna 40 och 41),

— från alla moderdjur och minst två ungar per kull när försöket avslutas på dag 13, och

— från alla vuxna hanar, vid försökets slut.

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

([1]) För en rad olika mätningar i serum och plasma, särskilt för glukos, är nattlig fasta att föredra. Den största orsaken till detta är att den ökade variationen som oundvikligen resulterar från icke-fastande, tenderar att maskera mer subtila effekter och göra tolkningen svår. Å andra sidan kan dock den nattliga fastan inkräkta på (de dräktiga) djurens allmänna metabolism och störa laktation och digivningsbeteende, och de kan även, särskilt under foderstudier, störa den dagliga exponeringen för testkemikalien. Om nattlig fasta används ska kliniska biokemiska bestämningar utföras efter utförandet av funktionsobservationer under vecka 4 i studien, för hanarnas del. Moderdjuren bör hållas i ytterligare en dag efter att ungarna tagits bort, på t.ex. PND 13). Moderdjuren ska fasta över natten mellan laktationsdag 13 och 14, och terminalt blod användas för kliniska kemiska parametrar.

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

58. Dessutom bör undersökning av serummarkörer av allmänna vävnadsskador övervägas. Andra bestämningar som bör utföras om testkemikaliens kända egenskaper kan, eller misstänks, påverka relaterade metaboliska profiler omfattar kalcium, fosfat, fastevärden av triglycerider och glukos samt specifika hormoner, methemoglobin och kolinesteras. Detta behöver undersökas från fall till fall.

59. Följande faktorer kan påverka variationen och de absoluta koncentrationerna för hormonbestämningarna:

— Tidpunkt för avlivningen beroende på hormonkoncentrationernas dygnsvariation.

— Avlivningsmetod för att undvika onödig stress hos djuren som kan påverka hormonkoncentrationerna.

— Testsatser för hormonbestämningar som kan skilja sig åt genom sina standardkurvor.

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

61. Om historiska basdata är otillräckliga bör hänsyn tas till hematologiska och kliniska biokemiska variabler innan doseringen påbörjas eller företrädesvis för en uppsättning djur som inte ingår i försöksgrupperna. För honorna ska data samlas in från digivande djur.

PATOLOGI

Obduktion

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

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

64. Sköldkörtlar ska sparas från alla vuxna hanar och honor samt från två 13 dagar gamla ungar från varje kull (en hane och en hona) och förvaras i det fixativ som bedöms lämpligast för en senare histopatologisk undersökning. Sköldkörtelns vikt kan bestämmas efter fixering. Putsning ska också göras väldigt försiktigt, och först efter fixeringen för att undvika vävnadsskador. Vävnadsskador kan påverka den histopatologiska analysen negativt. Blodprover bör tas från ett angivet ställe strax före eller i samband med avlivningen av djuren, och förvaras under lämpliga förhållanden (se punkt 56).

65. För minst fem vuxna hanar och honor som valts ut slumpmässigt från varje grupp (utom sådana som påträffats döende och/eller avlivats före försökets slut) ska all angränsande vävnad putsas bort från lever, njurar, binjurar, bräss, mjälte, hjärna och hjärta, beroende på vad som gäller, och organens våtvikt ska mätas snarast möjligt efter dissektion innan de hinner torka. Följande vävnader och organ bör bevaras i det mest lämpade fixeringsmediet med hänsyn till både typen av vävnad och planerade efterföljande histopatologiska undersökningar: alla större skador, hjärna (representativa områden inklusive cerebrum, cerebellum och pons), ryggmärg, ögon, mage, tunn- och tjocktarm (inklusive Peyers plack), lever, njurar, binjurar, mjälte, hjärta, bräss, luftstrupe och lungor (konserverade genom uppumpning med fixeringsmedel följt av nedsänkning), könskörtlar (testiklar och äggstockar), accessoriska könsorgan

(livmoder och livmoderhals, bitestiklar, prostata, sädesblåsor plus koaguleringskörtlar), vagina, urinblåsa, lymfkörtlar (utöver den mest proximala dräneringsnoden bör en annan lymfnod tas i enlighet med laboratoriets erfarenheter (16)), perifer nerv (ischias eller tibia) helst nära muskeln, skelettmuskel och ben med benmärg (sektion eller, alternativt, ett nymonterat benmärgsaspirat). Det rekommenderas att testiklarna fixeras genom nedsänkning i Bouins lösning eller modifierat fixeringsmedel enligt Davidson (16) (17) (18). Fixering med formalin rekommenderas inte för dessa vävnader. Tunica albuginea kan punkteras försiktigt och ytligt med en nål på organets båda poler för en snabb inträngning av fixeringsmedlet. Kliniska och andra fynd kan indikera behovet av att undersöka ytterligare vävnader. Även samtliga organ som sannolikt är målorgan, baserat på kunskap om testkemikaliens egenskaper, ska konserveras.

66. Följande vävnader kan ge värdefulla tecken på endokrinrelaterade effekter: könskörtlar (äggstockar och testiklar), accessoriska könsorgan (livmoder inklusive livmoderhals, bitestiklar, sädesblåsor med koaguleringskörtlar, dorsolaterala och ventrala prostata), vagina, hypofys, hanliga bröstkörtlar och binjurar). Förändringar i hanliga bröstkörtlar är inte tillräckligt väl dokumenterade, men denna parameter kan vara väldigt känslig för ämnen med östrogen verkan. Observation av organ/vävnader som inte nämns i punkt 65 är valfria.

67. Döda ungar och ungar som avlivas på dag 13 post partum, eller kort därefter, ska undersökas noga åtminstone externt för grova avvikelser. Särskild uppmärksamhet bör fästas vid de yttre reproduktionsorganen, som ska undersökas för tecken på avvikande utveckling.

Histopatologi

68. En fullständig histopatologisk analys bör utföras på bevarade organ och vävnader från de utvalda djuren i kontroll- och högdosgrupperna (med särskild tonvikt på spermatogenesens stadier i de hanliga könskörtlarna och histopatologin hos den interstitiala cellstrukturen i testiklarna). Sköldkörtlar från ungar och resterande vuxna djur kan undersökas vid behov. Dessa undersökningar bör utsträckas till djur i alla andra doseringsgrupper, om behandlingsrelaterade förändringar observeras i högdosgruppen. Vägledningen om histopatologi (10) omfattar detaljerad information om dissektion, fixering, sektionering och histopatologi av endokrina vävnader.

69. Alla stora skador bör undersökas. Målorgan från övriga dosgrupper bör undersökas som ett led i NOAEL-klarläggningsprocessen, och särskilt organ från grupper som påstås uppvisa NOAEL.

70. Om en satellitgrupp används bör en histopatologisk undersökning utföras på de vävnader och organ på vilka effekter har visats i de behandlade grupperna.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

71. Data bör rapporteras individuellt per djur. Därutöver bör alla data sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antal djur vid testets början, antal djur som hittats döda under testet eller som avlivats av humanitära skäl och tidpunkten för dödsfallen eller avlivningen, antal fertila djur, antal dräktiga honor, antal djur som visar tecken på toxicitet, en beskrivning av de tecken på toxicitet som observerats, inklusive tidpunkt för de första tecknen och deras varaktighet och allvarlighetsgrad, typ av histopatologiska förändringar, samt alla relevanta data om kullarna. I tillägg 3 finns ett tabellformat som har visat sig vara mycket användbart för bedömning av reproduktions- och utvecklingseffekter.

72. Om möjligt bör numeriska resultat utvärderas genom en lämplig och allmänt vedertagen statistisk metod. Vid jämförelser av effekten längs ett dosintervall bör man undvika användningen av multipla t-tester. Statistiska metoder ska väljas vid utformningen av studien. Statistiska analyser av AGD och bröstvårteretention ska baseras på data för varje individuell unge med beaktande av effekter på kullen ifråga. När så är lämpligt ska kullen utgöra analysenheten. Statistiska analyser av ungarnas kroppsvikt ska baseras på data för varje individuell unge med beaktande av kullstorlek. På grund av denna studies begränsade omfattning har statistiska analyser om ”signifikans” begränsat värde för flera endpoints, särskilt reproduktiva sådana. Några av de vanligaste metoderna, särskilt parametriska tester för mätning av centrala tendenser, är olämpliga. Om statistiska analyser används ska en lämplig metod för distributionen av den valda variabeln väljas ut innan testet påbörjas.

Utvärdering av resultaten

73. Resultaten bör utvärderas i termer av de observerade effekterna, inklusive obduktion och mikroskopiska iakttagelser. Utvärderingen ska omfatta förhållandet mellan testkemikaliedosen och närvaron eller frånvaron av samt incidensen och allvarlighetsgraden av avvikelser, inbegripet grova skador, identifierade målorgan, infertilitet, kliniska avvikelser, verkningar på reproduktionsförmågan och kullen, avvikelser rörande kroppsvikt, verkningar på mortaliteten samt alla andra toxiska effekter.

74. Eftersom hanarna endast behandlas under en kort tid bör histopatologin hos testiklar och bitestiklar bedömas tillsammans med fertilitetsdata vid uppskattningen av effekter på hanarnas fortplantningsförmåga. Historiska kontrolldata om reproduktion/utveckling (t.ex. kullstorlek, AGD, bröstvårteretention, T4-nivåer i serum), om sådana finns, kan också vara användbara vid tolkningen av studien.

75. Som kvalitetskontroll föreslås att historiska kontrolldata samlas in och att man för numeriska data beräknar variationskoefficienter, särskilt för de parametrar som kopplas till påvisande av hormonstörande ämnen. Dessa data kan sedan användas för jämförelseändamål när aktuella studier utvärderas.

Testrapport

76. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

— Källa, satsnummer, sista förbrukningsdag om detta anges.

— Testkemikaliens stabilitet, om den är känd.

Monokomponentämne:

— fysikaliskt tillstånd, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.

Multikomponentämne, UVCB-ämnen och blandningar:

— karakteriseras så långt som möjligt genom beståndsdelarnas kemiska identitet (se ovan), kvantitativa förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

Vehikel (i förekommande fall):

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

Försöksdjur:

— Art och stam som används.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Ursprung, inhysning, foder osv.

— Djurens individuella vikt vid testets början.

— Motivering för val av art, om inte råtta.

Testbetingelser:

— Grund för valet av dosnivå.

— Uppgifter om testkemikaliens sammansättning/foderberedning, uppnådd koncentration, beredningens stabilitet och homogenitet.

— Uppgifter om administreringen av testkemikalien.

— Omvandling från fodrets/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (ppm) till faktisk dos (mg/kg kroppsvikt/dag), i förekommande fall.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

— Detaljerad beskrivning av slumpmässighetsförfaranden för att välja ut ungar för avlivning, om avlivning skett.

Resultat:

— Kroppsvikt/kroppsviktsförändringar.

— Foder- och vattenkonsumtion, i förekommande fall.

— Uppgifter om toxiska reaktioner uppdelade efter kön och dos, inbegripet fertilitet, dräktighet och andra tecken på

— toxicitet.

— Dräktighetsperiodens längd. Toxiska eller andra verkningar på reproduktion, avkomma, postnatal tillväxt etc.

— Art, allvarlighetsgrad och varaktighet för kliniska observationer (vare sig de är reversibla eller ej).

— Bedömningar av sensorisk aktivitet, gripstyrka och motorisk aktivitet.

— Hematologiska tester med relevanta basvärden.

— Kliniska biokemiska tester med relevanta basvärden.

— Antal vuxna honor med normal eller onormal ägglossningscykel samt cykelns varaktighet.

— Antalet levande födda och postimplantationsförlust.

— Antal ungar med grova synliga avvikelser. En generell bedömning av yttre könsorgan, antalet småväxta ungar.

— Tidpunkt för dödsfall under testet eller huruvida djuren överlevde fram till avslutningen.

— Antal implantationer, kullstorlek och kullens vikt vid tiden för registrering.

— Uppgifter om ungarnas kroppsvikt.

— AGD på samtliga ungar (och deras kroppsvikt på dagen för mätning av AGD).

— Bröstvårteretention hos hanungar.

— Nivåer av tyreoideahormoner hos 13 dagar gamla ungar och vuxna hanar (samt på moderdjur och 4 dagar gamla ungar om?>detta har uppmätts).

— Kroppsvikt vid avlivningen samt absolut och relativ organvikt för föräldradjuren.

— Obduktionsfynd.

— En detaljerad redogörelse för alla histopatologiska fynd.

— Absorptionsdata (om sådana är kända).

— Statistisk bearbetning av resultaten, i tillämpliga fall.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

Tolkning av resultaten

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

LITTERATURHÄNVISNINGAR

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Tillgängligt på förfrågan hos Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27–29 oktober, 1992. Tillgängligt på förfrågan hos Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris

(3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. and Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). J. *Toxicol* Sci., 19, s. 141–149.

(4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. och Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. Fundam. Appl. *Toxicol*., kap. 18, s. 89–95.

(5) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, den 10–11 mars 1998, tillgänglig på förfrågan hos Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 217, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. och Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

(9) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, i Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document nr 60.

(11) Moser V.C., McDaniel K.M. and Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol.* Appl. *Pharmacol.*, 108, s. 267–283.

(12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. och Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. *Toxicol.*, 1, s. 233–236.

(13) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609.

(14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp och V.L. Reynolds. (1999). "Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights", Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment nr 151. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(16) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, nr 106, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(17) Hess RA och Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. I: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press. San Diego, CA, s. 52–85.

(18) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, s. 524-533.

(19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 43, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

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

Tillägg 1

DEFINITIONER (SE ÄVEN (20) OECD GD 150)

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

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

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

Antityreoid aktivitet är förmågan hos en kemikalie att undertrycka verkan av ett naturligt tyreoideahormon (t.ex. T_3) hos ett däggdjur.

Kemikalie ett ämne eller en blandning.

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

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

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

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

Nedsatt fertilitet innebär störningar i fortplantningsförmågan hos hanen eller honan.

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

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

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

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

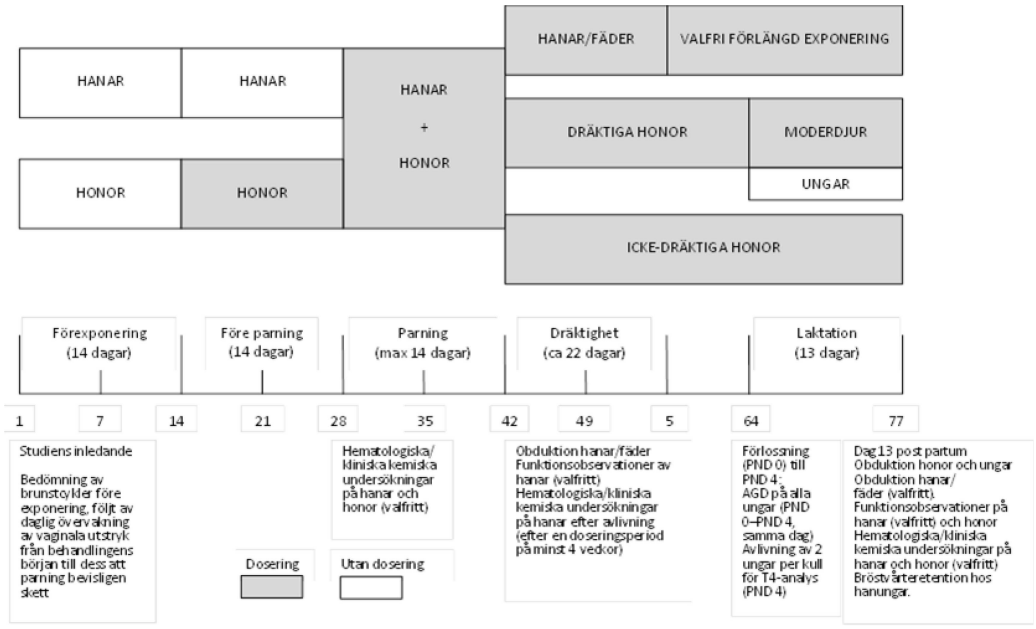
Testkemikalie varje ämne eller blandning som testas med denna testmetod.

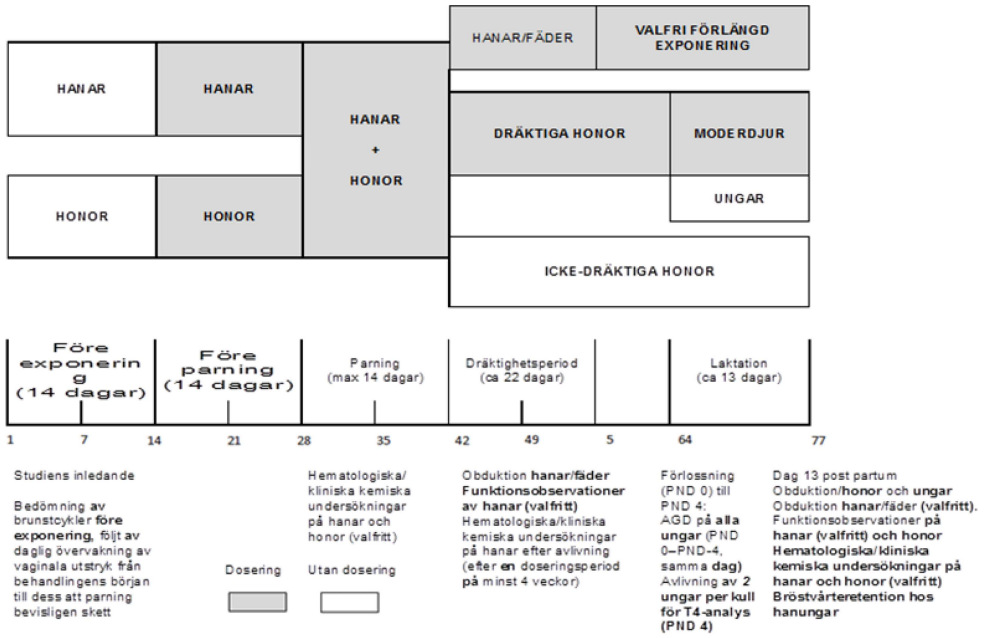
Tyreoid aktivitet är förmågan hos en kemikalie att agera som ett naturligt tyreoideahormon (t.ex. T_3) hos ett däggdjur.

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

Tillägg 2

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





Tillägg 3

SAMMANFATTNING I TABELLFORM AV EFFEKTER PÅ REPRODUKTION/UTVECKLING

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

IAKTTAGELSER	VÄRDEN				
Ungarnas vikt på dag 4 (medel)					
Ungarnas vikt på dag 13 (medel)					
Bröstvårteretention hos hanungarna på dag 13 (medel)					
ONORMALA UNGAR					
Moderdjur med 0					
Moderdjur med 1					
Moderdjur med ≥ 2					
FÖRLORAD AVKOMMA					
Prenatal (implantationer minus levande födda)					
Honor med 0					
Honor med 1					
Honor med 2					
Honor med ≥ 3					
Postnatal (levande födda minus levande ungar på PND 13)					
Honor med 0					
Honor med 1					
Honor med 2					
Honor med ≥ 3					

([1]) Parningsperiodens sista dag.

B.65 *IN VITRO*-MEMBRANBARRIÄRTEST FÖR HUDKORROSION

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 435 (2015). Hudkorrosion innebär att det uppstår en irreversibel skada på huden i form av synlig nekros genom epidermis och in i dermis, efter applicering av en testkemikalie enligt definitionen i Förenta nationernas globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (1) och Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP-förordningen) ([1]). Denna testmetod, som motsvarar OECD:s uppdaterade testriktlinje 435, innefattar ett in vitro-membranbarriärtest som kan användas för att identifiera frätande kemikalier. I testmetoden används ett konstgjort membran som är utformat för att ge en liknande respons på frätande kemikalier som djurhud in situ.

2. Hudkorrosivitet har traditionellt bedömts genom applicering av testkemikalien på levande djurs hud och bedömning av omfattningen av vävnadsskador efter en fastställd tidsperiod (2). Förutom denna testmetod har ett antal andra in vitro-testmetoder godkänts som alternativ (3)(4) till standardförfarandet för in vivo-test på kaninhud (kapitel B.4 i denna bilaga, motsvarar OECD TG 404) för att identifiera frätande kemikalier (2). Enligt GHS-systemets strategi för stegvis testning och utvärdering för bedömning och klassificering av hudfrätande verkan och OECD:s vägledningsdokument om ett integrerat synsätt på testning och bedömning av hudirritation/hudkorrosion (IATA) (*Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Skin Irritation/Corrosion*) rekommenderas användning av validerade och vedertagna *in vitro*-testmetoder för modulerna 3 och 4 (1)(5). I vägledningsdokumentet om IATA beskrivs flera moduler som grupperar olika informationskällor och analysverktyg, och där ges också i) vägledning om hur tillgängliga testdata och icke testdata kan integreras och användas i bedömningen av kemikaliers potential för hudirritation och hudkorrosion, och ii) förslag på hur man ska gå till väga när det krävs ytterligare testning, inbegripet när negativa resultat erhålls (5). I denna modulmetod kan positiva resultat från in vitro-testmetoder användas för att klassificera en kemikalie som frätande utan behov av djurförsök, och därigenom begränsa och förfina användningen av djur och minska den smärta och ångest som kan uppstå om djur används för detta ändamål.

3. Valideringsstudier har slutförts för in vitro-membranbarriärmodellen, som finns kommersiellt tillgänglig som Corrositex® (6)(7)(8). De visar en övergripande noggrannhet för att förutsäga hudkorrosivitet på 79 % (128/163), en sensitivitet på 85 % (76/89) och en specificitet på 70 % (52/74) för en databas med 163 ämnen och blandningar (7). Baserat på den bekräftade validiteten har denna validerade referensmetod (VRM) rekommenderats för användning som ett led i en stegvis teststrategi för att bedöma kemikaliers potential att orsaka hudkorrosion (5)(7). Innan en in vitro-membranbarriärmodell för hudkorrosion kan användas för lagstadgade ändamål bör metodens tillförlitlighet, relevans (noggrannhet) och begränsningar för det föreslagna användningsområdet bestämmas för att garantera dess likhet med VRM (9) i enlighet med de på förhand fastställda prestandastandarderna (PS) (10). OECD:s ömsesidiga erkännande av data kan endast garanteras efter det att eventuella föreslagna metoder, nya eller uppdaterade, som följer PS har granskats och inkluderats i motsvarande OECD-testriktlinje. För närvarande omfattas endast en in vitro-metod av OECD:s testriktlinje 435 och denna testmetod, nämligen den kommersiellt tillgängliga modellen Corrositex®.

4. Andra testmetoder för hudkorrosivitet baseras på användning av rekonstruerad human hud (OECD TG 431) (3) och isolerad råtthud (OECD TG 430) (4). Enligt denna testriktlinje delas frätande kemikalier även in i underkategorier, dvs. de tre GHS-underkategorierna för frätande verkan och FN:s tre transportförpackningsgrupper för faror i samband med frätande ämnen. Denna testriktlinje antogs första gången 2006 och uppdaterades 2015 för att överensstämma med vägledningsdokumentet om IATA och uppdatera förteckningen över kvalifikationsämnen.

DEFINITIONER

5. Definitioner av begreppen finns i tillägget.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

6. Det test som beskrivs i denna testmetod gör det möjligt att identifiera frätande testkemikalier och dela in dem i underkategorier enligt GHS/CLP (tabell 1). Testmetoden kan även användas för att fatta beslut om huruvida specifika kemikalieklasser är frätande eller ej, t.ex. organiska och oorganiska syror, syraderivat ([2]) och baser för vissa transporttestningsändamål (7) (11) (12). Denna testmetod beskriver ett generiskt förfarande som liknar den validerade

([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).

([2]) ”Syraderivat” är en icke-specifik klassificering och definieras generellt som en kemikalie som framställts från en syra, antingen direkt eller genom modifiering eller partiell substitution. Denna klass omfattar anhydrider, halosyror, salter och andra typer av kemikalier.

referenstestmetoden (7). Eftersom denna testmetod inte ger adekvat information om hudirritation bör nämnas att TM B.46 (motsvarande OECD TG 439) är särskilt avsedd för hälsoeffekten hudirritation in vitro (13). För en fullständig bedömning av lokala effekter på huden efter en enstaka dermal exponering se OECD:s vägledningsdokument om IATA (5).

Tabell 1

GHS-kategori och underkategorier för frätande verkan på huden [1]

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

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

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

TESTPRINCIP

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

9. Penetrationen av membranbarriären (eller genombrottet) kan mätas med hjälp av ett antal förfaranden eller kemiska detektionssystem, bland annat förändringar av färgen på ett pH-indikatorfärgämne eller andra egenskaper hos indikatorlösningen under barriären.

10. Det måste fastställas att membranbarriären är giltig, dvs. relevant och tillförlitlig, för den avsedda användningen. Detta kan till exempel göras genom att kontrollera att olika beredningar har likvärdiga barriäregenskaper, t.ex. att de kan upprätthålla en barriär mot icke frätande kemikalier och att kemikaliernas frätande egenskaper kan kategoriseras inom GHS-underkategorierna för frätande verkan (1). Klassificeringen beror på hur lång tid det tar för kemikalien att tränga igenom membranbarriären till indikatorlösningen.

DEMONSTRATION AV KOMPETENS

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

Tabell 2

Kvalifikationsämnen [1]

Ämne [2]	CAS-nr	Kemisk klass	GHS-underkategori in vivo [3]	GHS-underkategori in vitro [3]
Bortrifluoriddihydrat	13319-75-0	Oorganiska syror	1A	1A
Salpetersyra	7697-37-2	Oorganiska syror	1A	1A
Fosforpentaklorid	10026-13-8	Prekursorer för oorganiska syror	1A	1A
Valerylklorid	638-29-9	Syraklorider	1B	1B
Natriumhydroxid	1310-73-2	Oorganiska baser	1B	1B
1-2-aminoetylpiperazin	140-31-8	Alifatiska aminer	1B	1B
Bensensulfonylklorid	98-09-9	Syraklorider	1C	1C
N,N-dimetylbensylamin	103-83-3	Aniliner	1C	1C
Tetraetylenpentamin	112-57-2	Alifatiska aminer	1C	1C
Eugenol	97-53-0	Fenoler	NC	NC
Nonylakrylat	2664-55-3	Akrylater/metakrylater	NC	NC
Natriumvätekarbonat	144-55-8	Oorganiska salter	NC	NC

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

(2) Ämnen som testats rena eller med renhetsgrad ≥ 90 %

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

FÖRFARANDE

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

Kompatibilitetstest för testkemikalien

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

Provning av testkemikaliens tidskategori

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

MEMBRANBARRIÄRTESTMETODENS KOMPONENTER

Membranbarriär

15. Membranbarriären består av två komponenter: en proteinhaltig makromolekylär vattenbaserad gel och ett permeabelt stödjande membran. Den proteinhaltiga gelen bör vara impermeabel för vatten och fasta ämnen, men kan korrodera och bli permeabel. Den färdiga membranbarriären bör förvaras under på förhand fastställda förhållanden som har visat sig förebygga försämringar av gelen, t.ex. att den torkar, att det uppstår mikrobtillväxt eller att den förändras eller spricker, vilket försämrar prestandan. En godtagbar förvaringsperiod bör fastställas, och membranbarriärberedningarna bör inte användas efter den perioden.

16. Det permeabla stödjande membranet ger mekaniskt stöd till de proteinhaltiga gelen under gelbildningsprocessen och exponeringen för testkemikalien. Det stödjande membranet bör förebygga att gelen sjunker eller skiftar och bör ha hög permeabilitet för alla testkemikalier.

17. Den proteinhaltiga gelen, som består av protein, t.ex. keratin, kollagen eller blandningar av proteiner som bildar en gelmatris, fungerar som målet för testkemikalien. Det proteinhaltiga materialet placeras på det stödjande membranets yta och får bilda en gel innan membranbarriären placeras ovanpå indikatorlösningen. Den proteinhaltiga gelen bör ha en homogen tjocklek och densitet, utan luftbubblor eller defekter som kan påverka dess funktionella integritet.

Kemiskt detektionssystem

18. Indikatorlösningen, som är samma lösning som används för kompatibilitetstestet, bör reagera på förekomst av testkemikalien. Ett pH-indikatorfärgämne eller en kombination av sådana färgämnen, t.ex. kresolrött och metylorange som skiftar färg vid förekomst av testkemikalien bör användas. Mätsystemet kan vara visuellt eller elektroniskt.

19. Relevansen och tillförlitligheten hos detektionssystem som har utformats för att detektera testkemikaliens väg genom barriärmembranet bör bedömas för att fastställa vilka kemikalier som kan detekteras och de kvantitativa detektionsgränserna.

TESTPRESTANDA

Montering av testmetodens komponenter

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

Applicering av testkemikalien

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

Mätning av penetration av membranbarriären

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

Kontroller

23. I tester där en vehikel eller ett lösningsmedel används tillsammans med testkemikalien bör de vara kompatibla med membranbarriärsystemet, dvs. inte ändra dess integritet och testkemikaliens frätande verkan. I tillämpliga fall bör lösningsmedelskontrollen (vehikelkontrollen) testas parallellt med testkemikalien för att visa att lösningsmedlet (vehikeln) är kompatibelt med membranbarriärsystemet.

24. En positiv (frätande) kontroll med medelhög frätande aktivitet (t.ex. 110 ± 15 mg natriumhydroxid (GHS-kategori för frätande verkan 1B) (7), bör testas parallellt med testkemikalien för att bedöma om testsystemet fungerar på ett godtagbart sätt. En andra positiv kontroll i samma kemiska klass som testkemikalien kan vara användbar för en bedömning av den frätande kemikaliens relativa frätande potential. De valda positiva kontrollerna bör ha en medelhög frätande verkan (t.ex. GHS-underkategori 1B) för att det ska vara möjligt att upptäcka förändringar av penetrationstiden som kan vara oacceptabelt längre eller kortare än det fastställda referensvärdet, eftersom det tyder på att testsystemet inte fungerar ordentligt. För detta ändamål är extremt frätande (GHS-underkategori 1A) eller icke frätande kemikalier av begränsad nytta. En frätande kemikalie i GHS-underkategori 1B gör det möjligt att detektera för snabba eller för långsamma genombrottstider. En svagt frätande kemikalie (GHS-underkategori 1C) kan används som positiv kontroll för att mäta testmetodens förmåga att kontinuerligt skilja mellan svagt frätande och icke frätande kemikalier. Oavsett tillvägagångssätt bör ett godtagbart responsintervall för den positiva kontrollen utvecklas, baserat på det historiska intervallet av genombrottstider för de positiva kontroller som används, t.ex. medelvärdet ± 2–3 standardavvikelser. I varje studie bör den exakta genombrottstiden fastställas för den positiva kontrollen så att avvikelser utanför det godtagbara intervallet kan upptäckas.

25. En negativ (icke frätande) kontroll, t.ex. 10 % citronsyra, 6 % propionsyra (7), bör också testas parallellt med testkemikalien som en ytterligare kvalitetskontroll för att visa membranbarriärens funktionella integritet.

Acceptanskriterier för studien

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

Tolkning av resultat och korrosivitetsklassificering av testkemikalier

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

Tabell 3

Prediktionsmodellen Corrositex®

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

([1]) Testkemikalier med hög syra-/basreserv (6)
([2]) Testkemikalier med låg syra-/basreserv (6)
([3]) GHS-underkategorierna 1A, 1B och 1C motsvarar FN:s förpackningsgrupper I, II respektive III.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

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

Testrapport

29. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie och kontrollämnen:

— Monokomponentämne: kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.

— Multikomponentämne, UVCB-ämne och blandning: karakteriseras så långt som möjligt genom beståndsdelarnas kemiska identitet (se ovan), kvantitativa förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Fysikaliskt tillstånd, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Ursprung, satsnummer om sådant finns.

— Eventuell behandling av testkemikalien/kontrollämnet före testning (t.ex. uppvärmning, malning).

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

— Lagringsförhållanden.

Vehikel:

— Identifieringsdata, koncentration (om tillämpligt), volym som har använts.

— Motivering för val av vehikel.

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

Testbetingelser:

— Beskrivning av använda apparater och rutiner för förberedelse.

— Källa och sammansättning för den använda in vitro-membranbarriären.

— Indikatorlösningens sammansättning och egenskaper.

— Detektionsmetod.

— Mängder av testkemikalien och kontrollämnena.

— Antal replikat.

— Beskrivning och motivering av tidskategoriseringstestet.

— Appliceringsmetod.

— Observationstider.

— Beskrivning av de utvärderings- och klassificeringskriterier som tillämpats.

— Demonstrationen av kompetens för utförande av testmetoden ska göras före rutinanvändning, genom testning av kvalifikationsämnen.

Resultat:

— Tabelluppställning av individuella rådata från individuella test- och kontrollurval för varje replikat.

— Beskrivning av övriga observerade effekter.

— Härledda klassificeringar med hänvisning till prediktionsmodell och/eller beslutskriterier.

Diskussion av resultaten

Slutsatser

LITTERATUR

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), First Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Se http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Kapitel B.4 i denna bilaga, Akut hudirritation/hudkorrosion.

(3) Kapitel B.40a i denna bilaga, Hudkorrosion in vitro: Testmetod med rekonstruerad human epidermis (RhE).

(4) Kapitel B.40 i denna bilaga, Hudkorrosion in vitro: Transkutant elektriskt motstånd (TER).

(5) OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, 483–524.

(7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (nr 99–4495.)

(8) Gordon V.C., Harvell J.D. och Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37–45.

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, nr 34.

(10) OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris. Se http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf.

(11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. ATLA 29, 96–97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (femte översynen). (20 september 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Kapitel B.46 i denna bilaga, Hudirritation in vitro: Testmetod med rekonstruerad human epidermis. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH-publikation nr 04-4510. Se http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Se http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) United Nations (UN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Se http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Tillägg

DEFINITIONER

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

Kemikalie: Ett ämne eller en blandning.

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

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

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

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

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

Monokomponentämne: Ett ämne, definierat av sin kvantitativa sammansättning, där 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.

NC: Icke frätande.

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

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

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

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

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

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

Ämne: 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 denna testmetod.

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

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

ALLMÄN INLEDNING

OECD:s prestandabaserade testriktlinje

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

   — STTA-testet (stabilt transfekterad transaktivering) (2), som använder cellinjen (h) ERα-HeLa-9903, och

   — VM7Luc ER TA-testet (3), som använder cellinjen VM7Luc4E2 ([1]) som huvudsakligen uttrycker hERα med visst bidrag från hERββ(4)(5).

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

Bakgrund och principer för de tester som ingår i denna testmetod

2. OECD inledde en högprioriterad verksamhet under 1998 för att se över befintliga, och ta fram nya, testriktlinjer för screening och testning av potentiellt hormonstörande kemikalier. OECD:s begreppsram för provning och bedömning av potentiellt hormonstörande kemikalier reviderades 2012. Det ursprungliga och det reviderade ramverket är bifogade som bilagor till OECD:s vägledningsdokument om standardiserade testriktlinjer för utvärdering av kemikaliers hormonstörande egenskaper (8). Ramen har fem nivåer, vilka motsvarar olika nivåer av biologisk komplexitet. De ER-transaktiveringstester som beskrivs i denna testmetod tillhör nivå 2, som omfattar in vitro-tester som ger data om utvalda endokrinmekanismer/vägar. Denna testmetod består av in vitro-transaktiveringstester (TA) som är utformade för att identifiera östrogenreceptorantagonister och -agonister.

3. Östrogenernas interaktion med östrogenreceptorer kan påverka transkriptionen av östrogenkontrollerade gener, vilket kan leda till induktion eller inhibition av cellulära processer, även sådana som är nödvändiga för cellförökning, normal fosterutveckling och fortplantningsfunktionen (9)(10)(11). En störning av normala östrogensystem kan leda till skadliga effekter på normal utveckling (ontogenes), reproduktionshälsa och reproduktionssystemets tillstånd.

4. In vitro-transaktiveringstester grundas på en direkt eller indirekt interaktion mellan ämnena och en specifik receptor som reglerar transkriptionen av en rapportgenprodukt. Sådana tester har i stor utsträckning använts för att utvärdera det genuttryck som regleras av specifika nukleära receptorer, t.ex. östrogenreceptorer (12) (13) (14) (15) (16). De har föreslagits för detektering av östrogen transaktivering som regleras av östrogenreceptorer (17) (18) (19). Det finns minst två stora undertyper av nukleära östrogenreceptorer, α och β, som kodas av olika gener. De respektive proteinerna har olika biologiska funktioner, olika vävnadsdistribution och olika bindningsaffinitet hos liganderna (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). Nukleära ERα medierar den klassiska östrogena responsen (27)(28)(29)(30), och de flesta modeller som för närvarande utvecklas för att mäta aktivering eller inhibering av östrogenreceptorer är därför

specifika för ERα. Metoderna används för att identifiera kemikalier som aktiverar (eller inhiberar) östrogenreceptorerna efter ligandbindning, efter vilket receptor–ligand-komplexet binder sig till specifika DNA-responselement och transaktiverar en rapportgen, vilket i sin tur leder till ökat celluttryck hos ett markörprotein. Olika responser från rapportgener kan användas i dessa tester. I luciferasbaserade system omvandlar luciferasenzymet luciferassubstratet till en bioluminiscent produkt som kan mätas kvantitativt med en luminometer. Andra exempel på vanliga rapportgener är fluorescerande protein och *LacZ*-genen, som kodar för β-galaktosidas, en enzymprodukt som kan omvandla det färglösa substratet X-gal (5-brom-4-klor-indolyl-galaktopyranosid) till en blå produkt som kan kvantifieras med en spektrofotometer. Dessa rapportgener kan utvärderas snabbt och till låg kostnad med kommersiellt tillgängliga testkit.

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

6. Definitioner och förkortningar som används i denna testmetod beskrivs i tillägg 1.

Omfattning av och begränsningar hos transaktiveringstester

7. Dessa tester föreslås för screening- och prioriteringsändamål, men kan även ge mekanistisk information som kan användas i en sammanvägd bedömning. De behandlar transaktivering som inducerats genom kemisk bindning till östrogenreceptorer i ett in vitro-system. Resultaten bör således inte extrapoleras direkt till det intakta endokrina systemets komplexa signalering och reglering in vivo.

8. Transaktivering medierad av östrogenreceptorer är en av de viktigaste mekanismerna för hormonstörning, även om hormonstörningar även kan uppstå genom andra mekanismer, exempelvis i) interaktioner med andra receptorer och enzymsystem inom det endokrina systemet, ii) hormonsyntes, iii) metabolisk aktivering och/eller inaktivering av hormoner, iv) fördelningen av hormoner till målvävnader, och v) clearance av hormoner från kroppen. Inget av testerna i denna testmetod behandlar dessa verkningssätt.

9. Denna testmetod behandlar kemikaliers förmåga att aktivera (dvs. agera som agonister) och även att dämpa (dvs. agera som antagonister) transkription som är beroende av östrogenreceptorer. En del kemikalier kan, beroende på celltyp, uppvisa både agonistisk och antagonistisk aktivitet, och benämns selektiva östrogenreceptormodulatorer (SERM). Kemikalier som visar negativt resultat i dessa tester kan utvärderas i ett test av östrogenreceptorbindning innan slutsatsen dras att kemikalien inte binder till receptorn. Dessutom kommer testerna sannolikt endast att ge information om det ursprungliga ämnet, med tanke på in vitro-cellsystemens begränsade metaboliska kapacitet. Med tanke på att endast enstaka ämnen användes under valideringen har analysens tillämplighet på testblandningar inte behandlats. Testmetoden är emellertid teoretiskt tillämplig på testning av multikomponentämnen, UVCB-ämnen och blandningar. Innan testmetoden används på ett multikomponentämne, UVCB-ämne eller en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man överväga om, och i så fall varför, den kan ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag.

10. I informationssyfte innehåller tabell 1 agonist-testresultaten för de 34 ämnen som testades i båda de fullständigt validerade referenstestmetoder som beskrivs i denna testmetod. Av dessa ämnen är 26 klassificerade som definitiva ER-agonister och 8 som negativa baserat på publicerade rapporter, inklusive in vitro-tester av östrogenreceptorbindning och transaktivering och/eller uterotroft test (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34). Tabell 2 innehåller antagonist-testresultaten för de 15 ämnen som testades i båda de fullständigt validerade referenstestmetoder som beskrivs i denna testmetod. Av dessa ämnen är 4 klassificerade som definitiva/förmodade ER-agonister och 10 som negativa baserat på publicerade rapporter, inklusive in vitro-tester av östrogenreceptorbindning och transaktivering (2) (3) (18) (31). När det gäller de data som sammanfattas i tabellerna 1 och 2 överensstämde de två referenstestmetoderna till 100 procent i klassificeringarna av alla ämnen utom ett (Mifepriston) för antagonisttest, och varje ämne klassificerades korrekt som ER-agonist/antagonist eller som negativt. Kompletterande information om denna grupp av kemikalier och ytterligare kemikalier som har testats i STTA- och VM7Luc ER TA-testerna under valideringsstudierna ges i prestandastandarderna för ERTA (6)(7), tillägg 2 (tabellerna 1, 2 och 3).

Tabell 1

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

	Ämne	CAS-nr	STTA – test (1)			VM7Luc ER TA – test (2)		Datakälla för klassificering (4)		
			ER TA Aktivitet	PC_{10}-värde (M)	PC_{50}-värde (b) (M)	ER TA-aktivitet	EC_{50}-värde (b), (3) (M)	Övriga ER TA (c)	ER Bindemedel	Uterotrof
1	17ß-östradiol (a)	50-28-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$5{,}63 \times 10^{-12}$	POS (227/227)	POS	POS
2	17α-östradiol (a)	57-91-0	POS	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}40 \times 10^{-9}$	POS (11/11)	POS	POS
3	17α-etinylöst-radiol (a)	57-63-6	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$7{,}31 \times 10^{-12}$	POS (22/22)	POS	POS
4	17β-trenbolon	10161-33-8	POS	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	POS	$4{,}20 \times 10^{-8}$	POS (2/2)	NT	NT
5	19-nortestoste-ron (a)	434-22-0	POS	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}80 \times 10^{-6}$	POS (4/4)	POS	POS
6	4-kumylfenol (a)	599-64-4	POS	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}20 \times 10^{-7}$	POS (5/5)	POS	NT
7	4-*tert*-oktylfenol (a)	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	POS	$3{,}19 \times 10^{-8}$	POS (21/24)	POS	POS
8	Apigenin (a)	520-36-5	POS	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS (26/26)	POS	NT

	Ämne	CAS-nr	STTA – test (1)			VM7Luc ER TA – test (2)		Datakälla för klassificering (4)		
			ER TA Aktivitet	PC_{10}-värde (M)	PC_{50}-värde (b) (M)	ER TA-aktivitet	EC_{50}-värde (b), (3) (M)	Övriga ER TA (c)	ER Bindemedel	Uterotrof
9	Atrazin (a)	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Bisfenol A (a)	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	POS	$5{,}33 \times 10^{-7}$	POS (65/65)	POS	POS
11	Bisfenol B (a)	77-40-7	POS	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}95 \times 10^{-7}$	POS (6/6)	POS	POS
12	Bensylbutylftalat (a)	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}98 \times 10^{-6}$	POS (12/14)	POS	NEG
13	Kortikosteron (a)	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG (6/6)	NEG	NT
14	Kumestrol (a)	479-13-0	POS	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	POS	$1{,}32 \times 10^{-7}$	POS (30/30)	POS	NT
15	Daidzein (a)	486-66-8	POS	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	POS	$7{,}95 \times 10^{-7}$	POS (39/39)	POS	POS
16	Dietylstilbestrol (a)	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	POS	$3{,}34 \times 10^{-11}$	POS (42/42)	POS	NT
17	Dibutylftalat	84-74-2	POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POS (6/11)	POS	NEG
18	Etylparaben	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(ej PC_{50})	POS	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POS		NT
19	Östron (a)	53-16-7	POS	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	POS	$2{,}34 \times 10^{-10}$	POS (26/28)	POS	POS
20	Genistein (a)	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	POS	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS (100/102)	POS	POS

	Ämne	CAS-nr	STTA – test (1)			VM7Luc ER TA – test (2)		Datakälla för klassificering (4)		
			ER TA Aktivitet	PC_{10}-värde (M)	PC_{50}-värde (b) (M)	ER TA-aktivitet	EC_{50}-värde (b), (3) (M)	Övriga ER TA (c)	ER Bindemedel	Uterotrof
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Kaempferol (a)	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}99 \times 10^{-6}$	POS (23/23)	POS	NT
23	Kepon (a)	143-50-0	POS	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS (14/18)	POS	NT
24	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
25	Linuron (a)	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	NT
26	*meso*-hexestrol (a)	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	POS	$1{,}65 \times 10^{-11}$	POS (4/4)	POS	NT
27	Metyltestosteron (a)	58-18-4	POS	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}68 \times 10^{-6}$	POS (5/6)	POS	NT
28	Morin	480-16-0	POS	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}37 \times 10^{-6}$	POS (2/2)	POS	NT
29	Noretynodrel (a)	68-23-5	POS	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	POS	$9{,}39 \times 10^{-10}$	POS (5/5)	POS	NT
30	*p,p'*-metoxiklor (a)	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(ej PC_{50}) (b)	POS	$1{,}92 \times 10^{-6}$	POS (24/27)	POS	POS
31	Fenobarbital (a)	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT

	Ämne	CAS-nr	STTA – test (1)			VM7Luc ER TA – test (2)		Datakälla för klassificering (4)		
			ER TA Aktivitet	PC_{10}-värde (M)	PC_{50}-värde (b) (M)	ER TA-aktivitet	EC_{50}-värde (b), (3) (M)	Övriga ER TA (c)	ER Bindemedel	Uterotrof
32	Reserpin	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NT
33	Spironolakton (a)	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NT
34	Testosteron	58-22-0	POS	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}75 \times 10^{-5}$	POS (5/10)	POS	NT

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

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

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

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

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

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

(3) EC_{50}-medelvärdena beräknades med hjälp av värden som rapporterats från de laboratorier som deltog i VM7Luc ER TA-valideringsstudien (XDS, ECVAM och Hiyoshi) (3).

(4) Klassificeringen som ER-agonister eller som negativa grundades på information i ICCVAM:s bakgrundsdokument om analyser av östrogenreceptorbindning och transaktivering (31) samt på information från publikationer som offentliggjorts och granskats efter slutförandet av ICCVAM:s bakgrundsdokument (2) (3) (18) (31) (33) (34).
Anmärkningar: Alla tester inom denna testmetod omfattar inte samma mätningar. I vissa situationer kan inte EC_{50} beräknas eftersom det inte skapas en fullständig dosresponskurva. I STTA-testet är PC_{10}-värdet ett nyckelmått, men det kan även finnas andra exempel där en PCx ger användbar information.

Tabell 2

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

	Ämne [a]	CAS-nr	ER STTA-test [1]		VM7Luc ER TA-test [2]		ER STTA kandidat- effekter [4]	ICCVAM [5] Överenskommen klassificering	MeSH [6] Kemisk klass	Produktklass [7]
			ER TA Aktivitet	IC_{50}-värde [b] (M)	ER TA Aktivitet	IC_{50}-värde [b], [3] (M)				
1	4-hydroxitamoxifen	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	måttligt POS	POS	Kolväte (cykliskt)	Läkemedel
2	Dibenz[a,h]antracen	53-70-3	POS	Ej IC_{50}	POS	Ej IC_{50}	POS	PP	Polycykliska kolväten	Laboratoriekemikalie, naturprodukt
3	Mifepriston	84371-65-3	POS	$5{,}61 \times 10^{-6}$	NEG	—	svagt POS	NEG	Steroid	Läkemedel
4	Raloxifen HCl	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	måttligt POS	POS	Kolväte (cykliskt)	Läkemedel
5	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	POS	POS	Kolväte (cykliskt)	Läkemedel
6	17β-östradiol	50-28-2	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Steroid	Humant/veterinärt läkemedel
7	Apigenin	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Heterocyklisk förening	Färg, naturprodukt, farmaceutisk mellanprodukt

	Ämne [a]	CAS-nr	ER STTA-test [1]		VM7Luc ER TA-test [2]		ER STTA kandidat- effekter [4]	ICCVAM [5] Överenskommen klassificering	MeSH [6] Kemisk klass	Produktklass [7]
			ER TA Aktivitet	IC_{50}-värde [b] (M)	ER TA Aktivitet	IC_{50}-värde [b], [3] (M)				
8	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Heterocyklisk förening	Herbicid
9	Dibutylftalat	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Ester, ftalsyra	Ingrediens i kosmetika, industrikemikalie, mjukningsmedel
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	ej testat	PN	Heterocyklisk förening, pyrimidin	Svampmedel
11	Flavon	525-82-6	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Flavonoid, heterocyklisk förening	Naturprodukt, läkemedel
12	Flutamid	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Amid	Läkemedel, veterinärmedicin
13	Genistein	446-72-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Flavonoid, heterocyklisk förening	Naturprodukt, läkemedel
14	p-n-nonylfenol	104-40-5	NEG	—	NEG	—	ej testat	NEG	Fenol	Kemisk intermediär

	Ämne ([a])	CAS-nr	ER STTA-test ([1])		VM7Luc ER TA-test ([2])		ER STTA kandidat- effekter ([4])	ICCVAM ([5]) Överenskommen klassificering	MeSH ([6]) Kemisk klass	Produktklass ([7])
			ER TA Aktivitet	IC_{50}-värde ([b]) (M)	ER TA Aktivitet	IC_{50}-värde ([b]), ([3]) (M)				
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Kolväte (cykliskt)	Naturprodukt

Förkortningar: CAS-nummer = nummer i registret som förs av Chemical Abstracts Service, M = molar. IC_{50} = halva den maximala hämmande koncentrationen av testämnet. NEG = negativ. PN = förmodat negativ. POS = positiv. PP = förmodat positiv.

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

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

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

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

([3]) IC_{50}-medelvärdena beräknades med hjälp av värden som rapporterats från de laboratorier som deltog i VM7Luc ER TA-valideringsstudien (XDS, ECVAM och Hiyoshi) (3).

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

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

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

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

KOMPONENTER I ER TA-TESTET

Viktiga testdelar

11. Denna testmetod är tillämplig på tester som använder en stabilt transfekterad eller endogen ERα-receptor och en stabilt transfekterad rapportgen, under kontroll av ett eller flera φstrogenresponselement. Andra receptorer sesom ERβ kan dock förekomma. De är de huvudsakliga testkomponenterna.

Kontroller

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

Standardförfaranden för kvalitetskontroll

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

Demonstration av laboratoriets kompetens

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

15. För att visa prestanda och för kvalitetskontrolländamål bör laboratorierna sammanställa historiska databaser över data om agonister och antagonister med en referensstandard (t.ex. 17β-östradiol och tamoxifen), positiva och negativa kontrollkemikalier och lösningsmedelskontroll (t.ex. DMSO). Som utgångspunkt bör databasen skapas utifrån minst tio oberoende testomgångar med agonister (t.ex. 17β-östradiol) och tio oberoende testomgångar med antagonister (t.ex. tamoxifen). Resultaten från framtida tester av dessa referensstandarder och lösningsmedelskontroller bör läggas in i databasen så att den utökas för att säkerställa konsekvens och prestanda för det biologiska testet vid laboratoriet över tiden.

Tabell 3

Förteckning över (14) kvalifikationsämnen för agonisttest [8]

Nr [7]	Ämne	CAS-nr	Förväntad respons [1]	STTA-test			VM7Luc ER TA-test		Kemisk klass i MeSH [5]	Produktklass [6]
				PC_{10}-värde(M) [2]	PC_{50}-värde(M) [2]	Testkonc.intervall (M)	VM7Luc EC_{50}-värde (M) [3]	Högsta konc. för förberedande koncentrationsintervalltest (M) [4]		
14	Dietylstilbestrol	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} - 10^{-8}$	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Kolväte (cykliskt)	Läkemedel, veterinärmedicin
12	17α-östradiol	57-91-0	POS	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Steroid	Humant/veterinärt läkemedel
15	*meso*-hexestrol	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Kolväte (cykliskt), fenol	Humant/veterinärt läkemedel
11	4-*tert*-oktylfenol	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Fenol	Kemisk intermediär
9	Genistein	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Flavonoid, heterocyklisk förening	Naturprodukt, läkemedel
6	Bisfenol A	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Fenol	Kemisk intermediär

Nr (7)	Ämne	CAS-nr	Förväntad respons (1)	STTA-test			VM7Luc ER TA-test		Kemisk klass i MeSH (5)	Produktklass (6)
				PC_{10}-värde(M) (2)	PC_{50}-värde(M) (2)	Testkonc.intervall (M)	VM7Luc EC_{50}-värde (M) (3)	Högsta konc. för förberedande koncentrationsintervalltest (M) (4)		
2	Kaempferol	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flavonoid, heterocyklisk förening	Naturprodukt
3	Bensylbutylftalat	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Karboxylsyra, ester, ftalsyra	Mjukningsmedel, industrikemikalie
4	*p,p'*-metoxiklor	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Kolväte (halogenerat)	Bekämpningsmedel, veterinärmedicin
1	Etylparaben	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Karboxylsyra, fenol	Läkemedel, konserveringsmedel
17	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	—	10^{-10}–10^{-4}	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Heterocyklisk förening	Herbicid
20	Spironolakton	52-01-7	NEG	—	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Lakton, steroid	Läkemedel

Nr (7)	Ämne	CAS-nr	Förväntad respons (1)	STTA-test			VM7Luc ER TA-test		Kemisk klass i MeSH (5)	Produktklass (6)
				PC_{10}-värde(M) (2)	PC_{50}-värde(M) (2)	Testkonc.intervall (M)	VM7Luc EC_{50}-värde (M) (3)	Högsta konc. för förberedande koncentrationsintervalltest (M) (4)		
21	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	—	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Heterocyklisk förening	Läkemedel
22	Reserpin	50-55-5	NEG	—	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Heterocyklisk förening, indol	Läkemedel, veterinärmedicin

Förkortningar: CAS-nummer = nummer i registret som förs av Chemical Abstracts Service, EC_{50} = halva den maximala effektiva koncentrationen av testämnet. NEG = negativ. POS = positiv. PC_{10} (och PC_{50}) = koncentration av ett testämne vid vilken responsen är 10 % (eller 50 % för PC_{50}) av den respons som orsakas av den positiva kontrollen (E2, 1nM) i varje platta.

(1) Klassificeringen av ER-antagonisters aktivitet som positiv eller negativ grundades på ICCVAM:s bakgrundsdokument om test av östrogenreceptorbindning och transaktivering (31) samt på empiriska data och annan information från referensstudier som publicerats och granskats efter slutförandet av ICCVAM:s bakgrundsdokument. (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

(2) Värden rapporterade i *Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity – The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line* (30)

(3) EC_{50}-medelvärdena beräknades med hjälp av värden som rapporterats från de laboratorier som deltog i VM7Luc ER TA-valideringsstudien (XDS, ECVAM och Hiyoshi) (3).

(4) De rapporterade koncentrationerna var de högsta koncentrationer som testades (förberedande test) under valideringen av VM7Luc ER TA-testet. Om koncentrationen varierar mellan laboratorierna rapporteras den högsta koncentrationen. Se tabell 4-10 i *ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals* (3).

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

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

(7) Från tabell 1 (förteckning över referenskemikalier (22) för utvärdering av noggrannhet hos östrogenreceptoragonister) i prestandastandarderna (6).

(8) Om ett kvalifikationsämne inte längre finns kommersiellt tillgängligt kan ett ämne som har samma klassificering och är jämförbart när det gäller potens, verkningssätt och kemisk klass användas.

Tabell 4

Förteckning över (10) kvalifikationsämnen för antagonisttest

	Ämne [a]	CAS-nr	ER STTA-test [1]			VM7Luc ER TA-test [2]			ER STTA [1] kandidateffekter	ICCVAM [5] Överenskommen klassificering	MeSH [6] Kemisk klass	Produktklass [7]
			ER TA-aktivitet	IC_{50} (M)	Testkonc.intervall (M)	ER TA-aktivitet	IC_{50} [3] (M)	Högsta konc. för förberedande test (M) [4]				
1	4-hydroxitamoxifen	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	måttligt POS	POS	Kolväte (cykliskt)	Läkemedel
2	Raloxifen HCl	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	måttligt POS	POS	Kolväte (cykliskt)	Läkemedel
3	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} – 10^{-5}$	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	$2{,}69 \times 10^{-4}$	POS	POS	Kolväte (cykliskt)	Läkemedel
4	17β-östradiol	50-28-2	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	förväntas vara negativ (*)	PN	Steroid	Humant/veterinärt läkemedel
5	Apigenin	520-36-5	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterocyklisk förening	Färg, naturprodukt, farmaceutisk mellanprodukt
6	Dibutylftalat	84-74-2	NEG	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Ester, ftalsyra	Ingrediens i kosmetika, industrikemikalie, mjukningsmedel

	Ämne ([a])	CAS-nr	ER STTA-test ([1])			VM7Luc ER TA-test ([2])			ER STTA ([1]) kandidateffekter	ICCVAM ([5]) Överenskommen klassificering	MeSH ([6]) Kemisk klass	Produktklass ([7])
			ER TA-aktivitet	IC_{50} (M)	Testkonc.intervall (M)	ER TA-aktivitet	IC_{50} ([3]) (M)	Högsta konc. för förberedande test (M) ([4])				
7	Flavon	525-82-6	NEG	—	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	förväntas vara negativ (*)	PN	Flavonoid, heterocyklisk förening	Naturprodukt, läkemedel
8	Genistein	446-72-0	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	förväntas vara negativ (*)	NEG	Flavonoid, heterocyklisk förening	Naturprodukt, läkemedel
9	p-n-nonylfenol	104-40-5	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	ej testat	NEG	Fenol	Kemisk intermediär
10	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	förväntas vara negativ (*)	NEG	Kolväte (cykliskt)	Naturprodukt

Förkortningar: CAS-nummer = nummer i registret som förs av Chemical Abstracts Service, M = molar. IC_{50} = halva den maximala hämmande koncentrationen av testämnet. NEG = negativ. PN = förmodat negativ. POS = positiv.

(*) Klassificerat som negativt enligt litteraturgranskning (2).

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

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

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

([3]) IC_{50}-medelvärdena beräknades med hjälp av värden som rapporterats från de laboratorier som deltog i VM7Luc ER TA-valideringsstudien (XDS, ECVAM och Hiyoshi) (3).

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

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

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

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

Acceptanskriterier för testomgångar

16. Godkännandet eller förkastandet av en testomgång baseras på en utvärdering av de resultat som har erhållits för de referensstandarder och kontroller som använts för varje försök. Värdena för PC_{50} (EC_{50}) eller IC_{50} för referensstandarderna bör uppfylla acceptanskriterierna för det valda testet (se tillägg 2 för STTA och tillägg 3 för VM7Luc ER TA), och samtliga positiva/negativa kontroller bör klassificeras korrekt för varje godtaget försök. Laboratoriet bör visa att det har förmåga att utföra testet på ett konsekvent sätt genom att utveckla och underhålla en historisk databas för referensstandarderna och kontrollerna (se punkt 15). Standardavvikelser eller variationskoefficienter för medelvärden av parametrars anpassning till referensstandardkurvan erhållna från flera olika försök kan användas som ett mått på laboratoriets kunnighet att utföra testet. Dessutom bör följande principer för acceptanskriterierna vara uppfyllda:

— Laboratoriet bör förfoga över tillräckliga data för att kunna göra en kvantitativ bedömning av östrogenreceptorers aktivering (för agonisttest) eller undertryckning (för antagonisttest) dvs. effektivitet och potens.

— För att säkerställa tillräcklig sensitivitet bör rapportgenens genomsnittliga aktivitet för referenskoncentrationen av referensöstrogenet vara lägst det värde som anges i metoderna jämfört med vehikelkontrollen (lösningsmedelskontrollen). För STTA- och VM7Luc ER TA-testerna är detta fyra gånger medelvärdet för vehikelkontrollen på varje platta.

— De testade koncentrationerna bör hållas sig inom testkemikaliernas löslighetsintervall och bör inte uppvisa cytotoxicitet.

Analys av data

17. Det fastställda datatolkningsförfarandet för varje test bör användas för att klassificera positiv och negativ respons.

18. Om acceptanskriterierna uppfylls (punkt 16) innebär detta att testet fungerar korrekt, men det säkerställer inte att en viss testomgång kommer att ge korrekta data. En upprepning av resultaten från den första testomgången är den bästa indikationen på att korrekta data har erhållits. Om två testomgångar ger reproducerbara resultat (t.ex. resultaten från båda testomgångarna visar att en testkemikalie är positiv) är det inte nödvändigt att utföra en tredje testomgång.

19. Om två testomgångar inte ger reproducerbara resultat (t.ex. att en testkemikalie är positiv i en testomgång och negativ i nästa), eller om en högre precision krävs för resultatet av testet, bör minst tre oberoende testomgångar utföras. I ett sådant fall baseras klassificeringen på de två samstämmiga resultaten av de tre.

Allmänna datatolkningskriterier

20. Det finns för närvarande ingen allmänt överenskommen metod för att tolka ER TA-data. Både kvalitativa (t.ex. positiv/negativ) och/eller kvantitativa (t.ex. EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}) bedömningar av ER-medierad aktivitet bör dock baseras på empiriska data och välgrundade vetenskapliga bedömningar. Om det är möjligt bör positiva resultat karakteriseras av både effektens omfattning jämfört med vehikelkontrollen (lösningsmedelskontrollen) eller referensöstrogenet och den koncentration vid vilken effekten inträffar (t.ex. en EC_{50}, PC_{50}, RPC_{Max}, IC_{50} osv.).

Testrapport

21. Testrapporten ska innehålla följande information:

Test:

— Använt test.

— Kontroll/referensstandard/testkemikalie.

— Källa, satsnummer, sista förbrukningsdag om detta anges,

— Testkemikaliens stabilitet i sig, om den är känd.

— Testkemikaliens löslighet och stabilitet i lösningsmedlet, om detta är känt.

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

Monokomponentämne:

— fysikaliskt tillstånd, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.

Multikomponentämne, UVCB-ämnen och blandningar:

— karakteriseras så långt som möjligt genom beståndsdelarnas kemiska identitet (se ovan), kvantitativa förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

Lösningsmedel/vehikel:

— Karakterisering (typ, leverantör och sats).

— Motivering för val av lösningsmedel/vehikel.

— Testkemikaliens löslighet och stabilitet i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt.

Celler:

— Typ av celler och deras källa.

  • Har östrogenreceptorn ett endogent uttryck? Om så inte är fallet, vilken eller vilka receptorer transfekterades?

  • Använd(a) rapportgen(er) (inklusive källarter).

  • Transfektionsmetod.

  • Urvalsmetod för upprätthållande av stabil transfektion (i förekommande fall).

  • Är transfektionsmetoden relevant för stabila linjer?

— Antal cellpassager (från upptining).

— Antal passager för celler vid upptining.

— Metoder för underhåll av cellodlingar.

Testbetingelser:

— Löslighetsbegränsningar.

— Beskrivning av använda metoder för viabilitetsbedömning.

— Mediernas sammansättning, CO_2-koncentration.

— Testkemikaliens koncentrationer.

— Den tillsatta vehikelns och testkemikaliens volym.

— Inkubationstemperatur och luftfuktighet.

— Behandlingens varaktighet,

— Celltäthet i början av och under behandlingen.

— Positiva och negativa referensstandarder.

— Rapportgenreagenser (produktnamn, leverantör och partinummer).

— Kriterier för när testomgångar ska anses som positiva, negativa eller tvetydiga.

Acceptanskontroll:

— Induktionsförhållande för varje testplatta och om de uppfyller det minimum som krävs enligt testmetoden baserat på historiska kontroller.

— Faktiska värden för acceptanskriterier, t.ex. $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ och Hill-koefficient (Hillslope) för parallella positiva kontroller/referensstandarder.

Resultat:

— Rådata och normaliserade data.

— Maximalt induktionsförhållande.

— Cytotoxicitetsdata.

— I förekommande fall, lägsta effektiva koncentration (LEC).

— Värden för RPC_{Max}, PC_{Max}, PC_{50}, IC_{50} och/eller EC_{50}, i förekommande fall.

— Koncentration-responsförhållande, där det är möjligt.

— Eventuella statistiska analyser, tillsammans med fel- och konfidensmått (t.ex. SEM, SD, CV eller 95 % CI) samt en beskrivning av hur dessa värden har erhållits.

Diskussion av resultaten

Slutsats

LITTERATUR

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications,Series on Testing and Assessment (nr 34), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(2) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 225), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(4) Pujol P., et al.(1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): s. 5367–5373.

(5) Rogers J.M. och Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 13(1): s. 67–82.

(6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 173), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 174), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(8) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental Health and Safety Publications,Series on Testing and Assessment (nr 150), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: s. 20–26.

(10) Welboren W.J. et al. (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): s. 1073–89.

(11) Younes M. och Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol.* Lab. Med., 135(1): s. 63–66.

(12) Jefferson W.N., et al. (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, Journal of Chromatography B, 777(1–2): s. 179-189.

(13) Sonneveld E., et al. (2006). Comparison of *In Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol.* Sci., 89(1): s. 173-187.

(14) Takeyoshi M., et al. (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): s. 91–98.

(15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, ATLA Alternatives to Laboratory Animals,28(1): s. 81-118.

(16) Escande A., et al. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol,71(10): s. 1459–1469.

(17) Gray, L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol.* Lett, 102–103, 677–680.

(18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

(19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor ß – A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, Journal of Endocrinology, 163(3): s. 379-383.

(21) Ogawa S. et al. (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα *In Vivo* and *In Vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): s. 122-126.

(22) Enmark E. et al. (1997). Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,82(12): s. 4258-4265.

(23) Ball L.J. et al. (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): s. 204-211.

(24) Barkhem T. et al. (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): s. 105–112.

(25) Deroo B.J. och Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): s. 1703-–1714.

(26) Harris D.M. et al. (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): s. 558-568.

(27) Anderson J.N. Clark J.H. och Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): s. 1460-1468.

(28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): s. 515-522.

(29) Gorski J. et al. (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: s. 45-80.

(30) Jensen E.V., et al. (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3): s. s. 547–569.

(31) ICCVAM (2002). Background review document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (nr 03-4505.).

(32) Kanno J. et al. (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785–794.

(33) Kanno J., et al. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Dose Response Studies. Health Persp., 111:1530–1549.

(34) Kanno J., et al. (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

(35) Geisinger, et al. (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280–288.

(36) Baldwin, et al. (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649–654.

(37) Li, Y., et al. (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, s. 2072–2081.

(38) Rogers, J.M. och Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, s. 67-82.

Tillägg 1

DEFINITIONER OCH FÖRKORTNINGAR

Acceptanskriterier: Minimistandarder för experimentets prestanda avseende kontroller och referensstandarder. Alla acceptanskriterier ska uppfyllas för att ett experiment ska anses vara giltigt.

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

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

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

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

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

CF: The OECD Conceptual Framework for the Testing and Evaluation of Endocrine Disrupters (OECD:s begreppsram för provning och bedömning av hormonstörande ämnen).

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

Kemikalie: Ett ämne eller en blandning.

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

CV: Variationskoefficient (Coefficient of Variation).

DCC-FBS: dextranbelagt träkolsbehandlat fetalt bovinserum.

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

DMSO: Dimetylsulfoxid.

E2: 17β-östradiol.

EC50: halva den maximala effektiva koncentrationen av testkemikalien.

ED: hormonstörning.

hERα: Human östrogenreceptor alfa.

hERß: human östrogenreceptor beta.

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

ER: Östrogenreceptor.

ERE: östrogenreceptorelement.

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

ERTA: transaktivering av östrogenreceptor.

FBS: fetalt bovinserum.

HeLa: en odödlig human cervikal cellinje.

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

IC_{50}: Halva maximalt effektiva koncentrationen för en inhiberande testkemikalie.

ICCVAM: The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (i Förenta staterna).

Reproducerbarhet mellan laboratorier: Ett mått på i hur stor utsträckning olika kvalificerade laboratorier kan producera kvalitativt och kvantitativt liknande resultat, med användning av samma protokoll och samma testämnen. Reproducerbarheten mellan laboratorier fastställs under förvalideringen och valideringen och indikerar i hur stor utsträckning ett test framgångsrikt kan överföras mellan laboratorier, även kallat inter-laborativ reproducerbarhet (1).

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

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

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

MT: metallotionein.

MMTV: Mouse Mammary Tumor Virus.

OHT: 4-hydroxitamoxifen

PBTG: Prestandabaserad testriktlinje (Performance-Based Test Guideline)

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

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

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

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

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

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

Kompetens: Påvisad förmåga att korrekt genomföra ett test, innan okända ämnen testas.

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

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

Referenstestmetoder: De tester som PBTG 455 baserar sig på.

Relevans: Beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida detta förhållande är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl man genom testet korrekt kan mäta och prediktera den aktuella biologiska effekten. Relevans omfattar också överväganden om noggrannheten hos ett test (konkordans) (1).

Tillförlitlighet: Mått på i vilken utsträckning ett test kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tid, när den utförs enligt samma protokoll. Den bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier.

RLU: relativa ljusenheter.

RNA: ribonukleinsyra.

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

RPMI: RPMI 1 640-medium, kompletterat med 0,9 % Pen-Strep och 8,0 % fetalt bovinserum (FBS).

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

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

SD: Standardavvikelse (Standard Deviation).

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

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

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

STTA-test: *Stably Transfected Transactivation Assay*, ERα transkriptionell aktivering med användning av cellinjen HeLa 9 903.

Studie: hela det försöksarbete som utförs för att utvärdera ett enstaka specifikt ämne med användning av en viss testmetod. En studie omfattar samtliga steg, inklusive test av utspädning av testämnet i testmediet, förberedande test för att bestämma koncentrationsintervall, alla nödvändiga fullständiga testomgångar, dataanalyser, kvalitetssäkring, cytotoxicitetsbedömningar osv. När studien är slutförd är det möjligt att klassificera den använda testkemikaliens aktivitet på toxicitetsmålet (dvs. aktiv, inaktiv eller obestämd) och göra en uppskattning av den positiva referenskemikaliens potens.

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

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

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

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

Transkription: mRNA-syntes.

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

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

Validering: Processen enligt vilken pålitlighet och relevans för en särskild strategi, metod, ett särskilt test, en särskild process eller bedömning etableras för ett fastställt syfte (1).

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

VM7: en odödlig adenokarcinomcell som endogent uttrycker östrogenreceptorn.

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

Svag positiv kontroll: ett ämne med svag aktivitet som valts från förteckningen över referenskemikalier och inkluderas i alla tester för att bidra till att säkerställa att testmetoden fungerar korrekt.

([1]) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 av den 18 december 2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach), inrättande av en europeisk kemikaliemyndighet, ändring av direktiv 1999/45/EG och upphävande av rådets förordning (EEG) nr 793/93 och kommissionens förordning (EG) nr 1488/94 samt rådets direktiv 76/769/EEG och kommissionens direktiv 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG och 2000/21/EG (EUT L 304, 22.11.2007, s. 1).

Tillägg 2

STABILT TRANSFEKTERAD MÄNSKLIG ÖSTROGENRECEPTOR-A – TRANSAKTIVERINGSANALYS FÖR DETEKTION AV ÖSTROGENAGONISTISK OCH -ANTAGONISTISK AKTIVITET HOS KEMIKALIER MED ANVÄNDNING AV CELLINJEN HERA-HELA-9903

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR (SE ÄVEN ALLMÄN INLEDNING)

1. Detta transaktiveringstest (TA) använder cellinjen hERα-HeLa-9 903 för att detektera östrogenagonistisk aktivitet, medierad genom human östrogenreceptor alfa (hERα). Valideringsstudien för stabilt transfekterad transaktivering (*Stably Transfected Transactivation*) (STTA), som utförts av CERI (Japanese Chemicals Evaluation and Research Institute) med användning av cellinjen hERα-HeLa-9 903 för att detektera östrogenagonistisk och antagonistisk aktivitet medierad genom human östrogenreceptor alfa, visade att testmetoden är relevant och tillförlitlig för det avsedda syftet (1).

2. Denna testmetod är särskilt utformad för att detektera hERα-medierad transaktivering genom att mäta kemiluminiscens som endpoint. Ej receptormedierade luminiscenssignaler har dock rapporterats vid fytoöstrogenkoncentrationer högre än 1 μM till följd av överaktivering av luciferasrapportgenen (2) (3). Dosresponskurvan visar att den faktiska aktiveringen av östrogenreceptorsystemet inträffar vid lägre koncentrationer, men det luciferasuttryck som erhålls vid höga koncentrationer av fytoöstrogener eller liknande föreningar som misstänks producera fytoöstrogenlik överaktivering av luciferasrapportgenen, måste undersökas noggrant i stabilt transfekterade ER TA-testsystem (tillägg 1).

3. Avsnitten ”Allmän inledning” och ”Komponenter i ER TA-testet” bör läsas innan denna testmetod används för lagstadgade ändamål. Definitioner och förkortningar som används i denna testriktlinje beskrivs i tillägg 2.1.

PRINCIPER FÖR METODEN (SE ÄVEN ALLMÄN INLEDNING)

4. Denna testmetod används för att signalera östrogenreceptorns bindning med en ligand. Efter ligandbindning translokerar receptor–ligand-komplexet till kärnan, där det binder specifika DNA-responselement och transaktiverar en firefly-luciferasrapportgen, vilket leder till ökat celluttryck av luciferasenzym. Luciferin är ett substrat som luciferasenzymet omvandlar till en bioluminiscent produkt som kan mätas kvantitativt med en luminometer. Luciferasaktivitet kan utvärderas snabbt och till låg kostnad med ett antal kommersiellt tillgängliga testkit.

5. Testsystemet använder cellinjen hERα-HeLa-9 903, som härleds från en human cervikal tumör, med två stabilt infogade konstruktioner: i) Konstruktionen med hERαα-uttryck (som kodar för hela den humana receptorn), och ii) en konstruktion med en firefly-luciferas-rapportgen som bär fem tandemupprepningar av ett vitellogenin-östrogenreceptivt element (ERE), som drivs av ett MT-promotor (metallotionein) TATA-element från möss. MT TATA-genkonstruktionen från möss har visat bäst resultat, och används därför utbrett. Denna hERα-HeLa-9 903-cellinje kan således mäta en testkemikalies förmåga att inducera hERα-medierad transaktivering från luciferasgenuttrycket.

6. I ER-agonisttestet baseras datatolkningen på huruvida den maximala responsnivå som induceras av en agonistrespons motsvarar eller överskrider 10 % av den respons som induceras genom en maximalt inducerande koncentration (1 nM) av den positiva kontrollen (PC) 17β-östradiol (E2) (dvs. PC10). I ER-antagonisttestet baseras datatolkningen på huruvida responsen visar en minskning på minst 30 % i aktiviteten från den respons som induceras genom den spikade kontrollen (25 pM E2) utan cytotoxicitet. Dataanalys och tolkning diskuteras i detalj i punkterna 34–48.

FÖRFARANDE

Cellinjer

7. Den stabilt transfekterade cellinjen hERα-HeLa-9 903 bör användas i testet. Denna cellinje kan erhållas från cellbanken JRCB (Japanese Collection of Research Bioresources) ([1]) genom att man ingår ett materialöverföringsavtal (MTA).

8. Endast celler som karakteriseras som mykoplasmafria bör användas i testningen. RT-PCR (*Real Time Polymerase Chain Reaktion*) är den valda metoden för en känslig detektion av mykoplasmainfektion (4) (5) (6).

Cellinjens stabilitet

9. För att övervaka cellinjens stabilitet bör E2, 17α-östradiol, 17α-metyltestosteron och kortikosteron användas som referensstandarder för agonisttest. En fullständig koncentrationsresponskurva i det testkoncentrationsintervall som anges i tabell 1 bör mätas minst en gång varje gång testet utförs, och resultaten bör överensstämma med de resultat som anges i tabell 1.

10. Vad beträffar antagonisttest bör två fullständiga koncentrationskurvor för två referensstandarder, tamoxifen och flutamid, mätas samtidigt med varje testomgång. Det är viktigt att övervaka en korrekt kvalitativ klassificering som positiv eller negativ för de två kemikalierna.

Betingelser för cellodling och överföring till platta

11. Cellerna bör förvaras i EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) utan fenolrött, kompletterat med 60 mg/l antibiotiskt kanamycin och 10 % dextranbelagt träkolsbehandlat fetalt bovinserum (DCC-FBS), i en CO_2-inkubator (5 % CO_2) vid 37±1 °C. När cellerna når 75–90 % konfluens kan de subkultiveras vid 10 ml av 0,4 x 105 – 1 x 105 celler/ml för en cellodlingsskål på 100 mm. Cellerna bör suspenderas med 10 % FBS-EMEM (som är detsamma som EMEM med DCC-FBS) och sedan överföras till hål på en mikrotiterplatta vid en densitet på 1 x 104 celler/(100 µl x hål). Därefter bör cellerna förinkuberas i en 5 % CO_2-inkubator vid 37 ± 1 °C i tre timmar före kemisk exponering. Plastvaran bör vara fri från östrogenaktivitet.

12. För att bibehålla responsens integritet bör cellerna odlas mer än en passage från den frysta stamodlingen i det konditionerade mediet, men bör inte odlas mer än 40 passager. För cellinjen hERα-HeLa-9 903 kommer detta att ta mindre än tre månader. Cellernas prestanda kan dock minskas om de odlas under olämpliga odlingsförhållanden.

13. DCC-FBS kan beredas enligt beskrivningen i tillägg 2.2, eller erhållas från kommersiella källor.

Acceptanskriterier

Positiva och negativa referensstandarder för ER-agonisttest

14. Före och under studien bör testsystemets responsförmåga kontrolleras med hjälp av lämpliga koncentrationer av en stark östrogen (E2), en svag östrogen (17α-östradiol), en mycket svag agonist (17α-metyltestosteron) och ett negativt ämne (kortikosteron). Godtagbara intervallvärden som härletts från valideringsstudien (1) anges i tabell 1. Dessa fyra parallella referensstandarder bör ingå i varje försök och resultaten bör falla inom de givna godtagbara gränserna. Om så inte är fallet bör man fastställa orsaken till att acceptanskriterierna inte har uppfyllts (t.ex. hantering av cellerna, serum och antibiotika för kvalitet och koncentration), och därefter upprepa testet. När acceptanskriterierna har uppfyllts är det viktigt att cellodlingsmaterialet används på ett konsekvent sätt för att säkerställa minimal

([1]) JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan, fax +81-72-641-9812.

variation av värdena för EC_{50}, PC_{50} och PC_{10}. De fyra parallella referensstandarderna, som bör ingå i varje försök (som utförs under samma förhållanden, inklusive material, cellernas passagenivå och av samma tekniker), kan säkerställa testets sensitivitet, eftersom PC_{10} från de tre positiva referensstandarderna bör falla inom ett godtagbart intervall, vilket även gäller PC_{50} och EC_{50} om de kan beräknas (se tabell 1).

Tabell 1

Godtagbara intervallvärden för de fyra referensstandarderna för ER-agonisttestet

Namn	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Hillslope	Testintervall
17β-östradiol (E2) CAS-nr: 50-28-2	−11,4~−10,1	< − 11	-11,3~−10,1	0,7~1,5	10^{-14}~10^{-8}M
17α-östradiol CAS-nr: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10^{-12}~10^{-6}M
Kortikosteron CAS-nr: 50-22-6	—	—	—	—	10-^{10}~10-^{4}M
17α-metyltestosteron CAS-nr: 58-18-4	-6,0~-5,1	− 8,0~− 6,2	—	—	10-^{11}~10-^{5}M

Positiva och negativa referensstandarder för ER-antagonisttestet

15. Före och under studien bör testsystemets responsförmåga kontrolleras med hjälp av lämpliga koncentrationer av ett positivt ämne (tamoxifen) och ett negativt ämne (flutamid). Godtagbara intervallvärden som härletts från valideringsstudien (1) anges i tabell 2. Dessa två parallella referensstandarder bör ingå i varje försök och resultaten bör bedömas som korrekta enligt kriterierna. Om så inte är fallet bör man fastställa orsaken till att kriterierna inte har uppfyllts (t.ex. hantering av cellerna, kvalitet och koncentration hos serum och antibiotika), och därefter upprepa testet. Dessutom bör IC_{50}-värden för ett positivt ämne (tamoxifen) beräknas och resultaten bör falla inom givna godtagbara gränser. När acceptanskriterierna har uppfyllts är det viktigt att cellodlingsmaterialet används på ett konsekvent sätt för att säkerställa minimal variation hos IC50-värdena. De två parallella referensstandarderna, som bör ingå i varje försök (som utförs under samma förhållanden, inklusive material, cellernas passagenivå och av samma tekniker), kan säkerställa testets sensitivitet (se tabell 2).

Tabell 2

Kriterier och godtagbara intervallvärden för de två referensstandarderna för ER-antagonisttestet

Namn	Kriterier	$LogIC_{50}$	Testintervall
Tamoxifen CAS-nr: 10 540-29-1	Positivt: IC50 bör beräknas.	−5,942~−7,596	10-10~10-5M
Flutamid CAS-nr: 13 311-84-7	Negativt: IC30 bör inte beräknas.	—	10-10 ~10-5M

Positiva kontroller och vehikelkontroller

16. Den positiva kontrollen för ER-agonisttest (1 nM av E2) och för ER-antagonisttest (10μM tamoxifen) bör testas i minst tre replikat på varje platta. Den vehikel som används för att lösa upp testkemikalien bör testas som vehikelkontroll i minst tre replikat på varje platta. Om en annan vehikel används i den positiva kontrollen än för testkemikalien, bör en annan vehikelkontroll utöver denna vehikelkontroll testas i minst tre replikat på samma platta med den positiva kontrollen.

Kvalitetskriterier för ER-agonisttest

17. Medelvärdet för luciferasaktiviteten i den positiva kontrollen (1 nM E2) bör vara minst fyra gånger medelvärdet för den positiva kontrollen på varje platta. Detta kriterium fastställs på grundval av hur tillförlitliga endpoint-värdena från valideringsstudien är (historiskt mellan fyra och trettio gånger).

18. När det gäller kvalitetskontrollen av testet bör den x-faldiga induktion som motsvarar PC10-värdet för den parallella positiva kontrollen (1 nM E2) vara högre än n 1+2SD av den x-faldiga induktionen (= 1) för den parallella vehikelkontrollen. För prioriteringssyften kan PC10-värdet vara användbart för att förenkla den nödvändiga dataanalysen jämfört med en statistisk analys. En statistisk analys ger visserligen information om signifikans men är inte en kvantitativ parameter för den koncentrationsbaserade potentialen, och är därför mindre användbar i prioriteringssyfte.

Kvalitetskriterier för ER-antagonisttest

19. Medelvärdet för luciferasaktiviteten i den spikade kontrollen (25 pM E2) bör vara minst fyra gånger medelvärdet för den positiva kontrollen på varje platta. Detta kriterium fastställs på grundval av hur tillförlitliga endpoint-värdena från valideringsstudien är.

20. Vad gäller kvalitetskontrollen av testet bör den relativa transkriptionella aktiveringen (RTA) av 1 nM E2 vara större än 100 %, RTA av 1μM 4-hydroxitamoxifen (OHT) vara mindre än 40,6 % och RTA av 100 μM Digitonin (Dig) vara mindre än 0 %.

Demonstration av laboratoriets kompetens (se punkt 14 och tabellerna 3 och 4 i ”Komponenter i ER TA-test” i denna testmetod).

Vehikel

21. Dimetylsulfoxid (DMSO) eller ett lämpligt lösningsmedel vid samma koncentration som används för de olika positiva och negativa kontrollerna samt testkemikalierna bör användas som parallell vehikelkontroll. Testkemikalierna bör lösas upp i ett lämpligt lösningsmedel som är blandbart med cellmediet. Vatten, etanol (renhetsgrad 95 % till 100 %) och DMSO är lämpliga vehiklar. Om DMSO används bör nivån inte överskrida 0,1 % (v/v). För alla vehiklar ska det visas att den maximala volym som används inte är cytotoxisk och inte har en störande verkan på genomförandet av testet.

Beredning av testkemikalierna

22. Generellt bör testkemikalierna lösas upp i DMSO eller ett annat lämpligt lösningsmedel och spädas ut i omgångar med samma lösningsmedel vid ett gemensamt intervall på 1:10 för att bereda lösningar med utspädning med mediet.

Löslighet och cytotoxicitet: överväganden för koncentrationsintervalltest

23. Ett förberedande test bör göras för att fastställa lämpligt koncentrationsintervall för den kemikalie som ska testas och för att utröna om testkemikalien har några löslighets- och cytotoxicitetsproblem. Inledningsvis testas kemikalierna upp till den högsta koncentrationen på 1 μl/ml, 1 mg/ml eller 1 mM, beroende på vilken koncentration som är lägst. Baserat på omfattningen av cytotoxicitet eller bristande lösningsförmåga som observerats under det förberedande testet, bör den första definitiva testomgången testa kemikalien vid logaritmisk seriespädning, med utgångspunkt från den högsta godtagbara koncentrationen (t.ex. 1 mM, 100μM, 10μM, osv.). Förekomst av grumlighet, fällningar eller cytotoxicitet ska noteras. Koncentrationerna i den andra och vid behov den tredje testomgången bör om nödvändigt justeras för att bättre karakterisera koncentrationens responskurva och undvika koncentrationer som konstateras vara olösliga eller ger överdriven cytotoxicitet.

24. För ER-agonister och ER-antagonister kan ökande nivåer av cytotoxicitet avsevärt ändra eller eliminera den typiska sigmoida (S-formiga) responsen, vilket bör vägas in i datatolkningen. Testmetoder för cytotoxicitet som kan ge information om 80 % cellviabilitet bör användas, med hjälp av ett lämpligt test baserat på laboratoriets erfarenhet.

25. Om resultatet av cytotoxicitetstestet visar att koncentrationen av testkemikalien har minskat cellantalet med 20 % eller mer bör denna koncentration anses vara cytotoxisk, och koncentrationer vid eller över den cytotoxiska koncentrationen bör undantas från utvärderingen.

Kemisk exponering och beredning av testplattor

26. Förfarandet för kemiska utspädningar (steg-1 och steg-2) samt exponering till cellerna (steg-3) kan utföras enligt följande:

Steg-1: Varje testkemikalie bör spädas ut i omgångar i DMSO eller ett lämpligt lösningsmedel och överföras till hålen i en mikrotiterplatta för att uppnå slutliga seriekoncentrationer enligt det förberedande testet för att bestämma koncentrationsintervall (vanligen i serier av exempelvis 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM och 10 pM (10^{-3}–10^{-11} M)) för triplikattestning.

Steg-2: Kemisk utspädning: Späd först ut 1,5 µl av testkemikalien i lösningsmedlet till en volym på 500 µl av mediet.

Steg-3: Kemisk exponering av cellerna: Överför 50 µl spädning till mediet (som förbereddes i steg-2) till en testbrunn som innehåller 10^4 celler/100 µl/brunn.

Den rekommenderade slutliga volymen av medium som behövs för varje brunn är 150 µl. Testprov och referensstandarder kan fördelas enligt tabellerna 3 och 4.

Tabell 3

Exempel på fördelning av koncentrationer av referensstandarderna i testplattan i ER-agonisttestet

Rad	17α-metyltestosteron			Kortikosteron			17α-östradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 µM)	→	→	100 µM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 µM)	→	→	10 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Vehikelkontroll (0,1 % DMSO). PC: Positiv kontroll (1 nM E2)

27. Referensstandarderna (E2, 17α-östradiol, 17−μετψλτεστοστερονμοχηοκορτικοστερονκκβββρρτεσταστιιαρφεετεστομγΣνγνναβελλτττττHål för positiva kontroller som behandlas med 1 nM av E2 som kan ge maximal induktion av E2 och hål för vehikelkontroll som endast behandlas med DMSO (eller lämpligt lösningsmedel) bör ingå i varje testplatta (tabell 4). Om celler från olika källor (t.ex. olika passageantal, olika partier osv.) används i samma försök bör referensstandarderna testas för varje cellkälla.

Tabell 4

Exempel på fördelning av koncentrationer av test- och kontrollkemikalierna i testplattan i ER-agonisttest

Rad	Testkemikalie 1			Testkemikalie 2			Testkemikalie 3			Testkemikalie 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	1 mM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	100 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	10 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	1 μM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Vehikelkontroll (0,1 % DMSO). PC: Positiv kontroll (1 nM E2)

Tabell 5

Exempel på fördelning av koncentrationer av referensstandarderna i testplattan i ER-antagonisttest

Rad	Tamoxifen			Flutamid			Testkemikalie 1			Testkemikalie 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	10 μm	→	→	10 μm	→	→	10 μm	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	1 μm	→	→	1 μm	→	→	1 μm	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 μM OHT	→	→	100 μM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Vehikelkontroll (0,1 % DMSO), PC: Positiv kontroll (1 nM E2), OHT :4-hydroxitamoxifen, Dig: Digitonin.

= spikad med 25pM E2.

28. För att utvärdera kemikaliers antagonistiska aktivitet bör testhålen i raderna A till G spikas med 25pM E2. Referensstandarderna (tamoxifen och flutamid) bör testas i varje testomgång. Hål för positiva kontroller som behandlats med 1 nM av E2, som kan användas som kvalitetskontroll för cellinjen hERα-HeLa-9 903, hål för vehikelkontroller som behandlats med DMSO (eller lämpligt lösningsmedel), 0,1 % DMSO-hål som behandlats med en tillsats av DMSO till den spikade E2 motsvarande hål med ”spikad kontroll”, hål som behandlats med den slutliga koncentrationen 1 μM OHT och hål som behandlats med 100 μM Dig bör ingå i varje testplatta (tabell 5). De efterföljande testplattorna bör utformas på samma sätt, men utan referensstandardhålen (tabell 6). Om celler från olika källor (t.ex. olika passageantal, olika partier osv.) används i samma försök bör referensstandarderna testas för varje cellkälla.

Tabell 6

Exempel på fördelning av koncentrationer av test- och kontrollkemikalierna i testplattan i ER-antagonisttest

Rad	Testkemikalie 1			Testkemikalie 2			Testkemikalie 3			Testkemikalie 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 μM OHT	→	→	100 μM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Vehikelkontroll (0,1 % DMSO), PC: Positiv kontroll (1 nM E2), OHT: 4-hydroxytamoxifen, Dig: Digitonin.

: Spikad med 25pM E2.

29. Avsaknaden av kanteffekter bör bekräftas i förekommande fall, och om kanteffekter misstänks bör plattans utformning ändras för att undvika sådana effekter. Man kan till exempel använda en platta utan kanthål.

30. Efter tillsättningen av kemikalierna bör plattorna inkuberas i en 5 % CO_2-inkubator vid 37 ± 1test °C i 20–24 timmar för att inducera rapportgenprodukterna.

31. Dessa föreningar bör behandlas särskilt försiktigt, eftersom de är mycket flyktiga. I sådana fall kan närliggande kontrollhål skapa falska positiva värden, och detta bör övervägas mot bakgrund av de förväntade och historiska kontrollvärdena. I de enstaka fall där flyktighet kan vara ett problem kan användning av ”plattförseglare” bidra till att effektivt isolera individuella hål under testningen, och rekommenderas därför i dessa fall.

32. Upprepade definitiva tester av samma kemikalie bör utföras på olika dagar för att säkerställa oberoende.

Luciferastest

33. En kommersiell luciferastestreagens (t.ex. Steady-Glo® Luciferase Assay System [Promega, E2510 eller motsvarande]) eller ett standardsystem för luciferastest (t.ex. Promega, E1500 eller motsvarande) kan användas för testet så länge acceptanskriterierna är uppfyllda. Testreagenserna bör väljas beroende på sensitiviteten hos den luminometer som ska användas. Om standardsystemet för luciferastest används bör lyseringsreagens för cellodling (t.ex. Promega, E1531 eller motsvarande) användas innan substratet tillförs. Luciferasreagensen bör appliceras enligt tillverkarens anvisningar.

DATAANALYS

ER-agonisttest

34. För att få fram den relativa transkriptionella aktiviteten jämfört med den positiva kontrollen (1 nM av E2) i ER-agonisttestet kan luminiscenssignalerna från samma platta analyseras enligt följande steg (andra likvärdiga matematiska processer är också godtagbara:

Steg 1. Beräkna medelvärdet för vehikelkontrollen.

Steg 2. Subtrahera medelvärdet för vehikelkontrollen från varje hålvärde för att normalisera data.

Steg 3. Beräkna medelvärdet för den normaliserade positiva kontrollen.

Steg 4. Dividera det normaliserade värdet för varje hål i plattan med medelvärdet för den normaliserade positiva kontrollen (PC = 100 %).

Det slutliga värdet för varje hål utgör den relativa transkriptionella aktiviteten för det hålet jämfört med PC-responsen.

Steg 5. Beräkna medelvärdet för den relativa transkriptionella aktiviteten för varje koncentrationsgrupp av testkemikalien. Det finns två dimensioner av responsen: den genomsnittliga transkriptionella aktiviteten (respons) och den koncentration vid vilken responsen inträffar (se följande avsnitt).

Överväganden i fråga om induktion av EC_{50}, PC_{50} och PC_{10}

35. Det krävs en fullständig koncentrationsresponskurva för att beräkna EC50, men detta kanske inte alltid är möjligt eller praktiskt till följd av begränsningar i testkoncentrationsintervallet (till exempel på grund av problem med cytotoxicitet eller löslighet). Eftersom EC50 och högsta induktionsnivå (motsvarande toppvärdet i Hill-ekvationen) är informativa parametrar bör dessa rapporteras om så är möjligt. Lämplig statistisk programvara bör användas för beräkningen av EC50 och högsta induktionsnivå (t.ex. statistikprogramvaran Graphpad Prism). Om Hills logistiska ekvation är tillämplig på koncentrationsresponsdata bör EC50 beräknas enligt följande ekvation (7):

Y = Bottom + (Top-Bottom) / (1+10 exp ((log EC50 -X) x Hill slope)), där

X är koncentrationens logaritm, och

Y är svaret. Y startar i botten och går upp till toppen i en S-kurva. Botten är fastställd till noll i Hills logistiska ekvation.

36. Följande uppgifter bör lämnas för varje testkemikalie:

RPCMax, som är den maximala responsnivå som induceras av en testkemikalie, uttryckt som en procentenhet av den respons som 1 nM E2 inducerar på samma platta, samt PC_{Max} (den koncentration som sammanhänger med RPCMax), och

för positiva kemikalier, de koncentrationer som inducerar PC10 och, i förekommande fall, PC50.

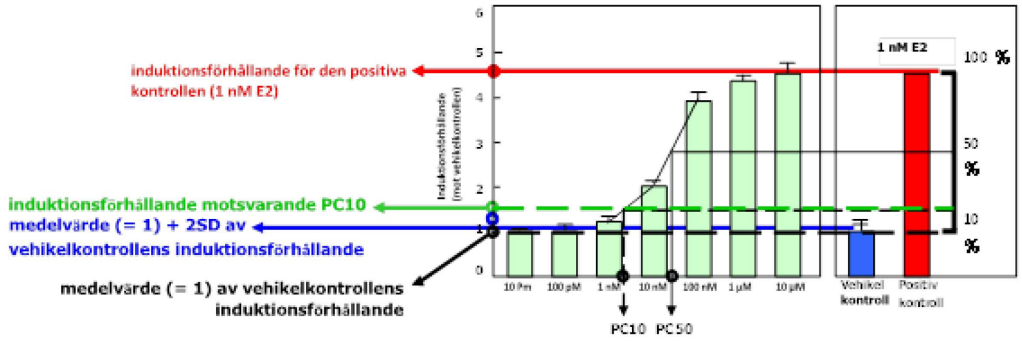
37. PCx-värdet kan beräknas genom interpolering mellan två punkter på X-Y-koordinaten, en omedelbart över och en omedelbart under ett PCx-värde. När de datapunkter som ligger omedelbart över och under PCx-värdet har koordinaterna (a,b) respektive (c,d) kan PCx-värdet beräknas med följande ekvation:

$$\log[PCx] = \log[c]+(x-d)/(d-b)$$

38. PC-värdena beskrivs i figur 1 nedan.

Figur 1

Exempel på härledning av PC-värden PC (1 nM of E2) induceras på varje testplatta.



ER-antagonisttest

39. För att få fram den relativa transkriptionella aktiviteten (RTA) jämfört med den spikade kontrollen (25 pM av E2) i ER-antagonisttestet kan luminiscenssignalerna från samma platta analyseras enligt följande steg (andra likvärdiga matematiska processer är också godtagbara:

Steg 1. Beräkna medelvärdet för vehikelkontrollen.

Steg 2. Subtrahera medelvärdet för vehikelkontrollen från varje hålvärde för att normalisera data. Steg 3. Beräkna medelvärdet för den normaliserade spikade kontrollen.

Steg 4. Dividera det normaliserade värdet för varje hål i plattan med medelvärdet för den normaliserade spikade kontrollen (spikad kontroll = 100 %).

Det slutliga värdet för varje hål utgör den relativa transkriptionella aktiviteten för det hålet jämfört med responsen på den spikade kontrollen.

Steg 5. Beräkna medelvärdet för den relativa transkriptionella aktiviteten för varje behandling.

Överväganden i fråga om induktion av IC_{30} och IC_{50}

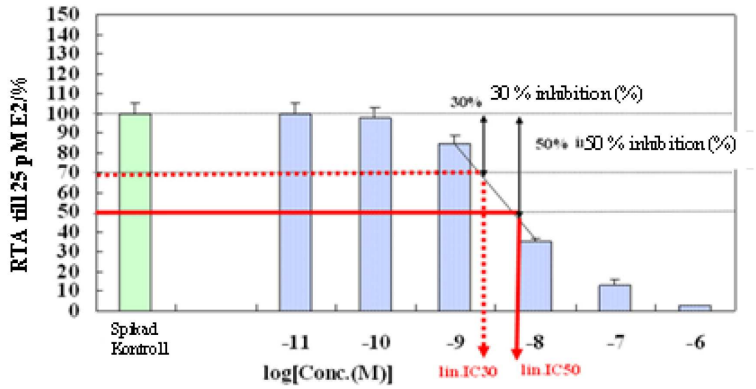
40. För positiva kemikalier bör de koncentrationer som inducerar IC30 och i förekommande fall IC50 anges.

41. ICx-värdet kan beräknas genom interpolering mellan två punkter på X-Y-koordinaten, en omedelbart över och en omedelbart under ett ICx-värde. När de datapunkter som ligger omedelbart över och under ICx-värdet har koordinaterna (c,d) respektive (a,b) kan ICx-värdet beräknas med följande ekvation:

lin ICx = a-(b-(100-x)) (a-c) /(b-d)

Figur 2

Exempel på hur man härleder IC-värden Den spikade kontrollen (25 pM E2) inkluderas på varje testplatta.



RTA: relativ transkriptionsaktivitet.

42. Resultaten bör baseras på två (eller tre) oberoende testomgångar. Om två testomgångar ger jämförbara och därför reproducerbara resultat är det inte nödvändigt att utföra en tredje testomgång. För att vara godtagbara bör resultaten

— uppfylla acceptanskriterierna (se Acceptanskriterier, punkterna 14–20),

— vara reproducerbara.

Datatolkningskriterier

Tabell 7

Positiva och negativa beslutskriterier i ER-agonisttest

Positiv	Om ett RPC_{Max} erhålls som motsvarar eller överskrider 10 % av responsen i den positiva kontrollen i minst två av två eller två av tre testomgångar.
Negativ	Om RPC_{Max} inte når minst 10 % av responsen i den positiva kontrollen i två av två eller två av tre testomgångar.

Tabell 8

Positiva och negativa beslutskriterier i ER-antagonisttest

Positiv	Om IC30 beräknas i minst två av två eller två av tre testomgångar.
Negativ	Om IC30 inte kan beräknas i två av två eller två av tre testomgångar.

43. Datatolkningskriterierna anges i tabellerna 7 och 8. Positiva resultat karakteriseras av både effektens omfattning och den koncentration vid vilken effekten uppstår. Båda dessa mål uppnås genom att resultaten uttrycks som en koncentration vid vilken 50 % (PC50) eller 10 % (PC10) av PC-värdena uppnås för agonisttestet, och 50 % (IC50) eller 30 % (IC30) av värdet för den spikade kontrollen hämmas för antagonisttestet. Testkemikalien anses dock vara positiv om den maximala respons som induceras av testkemikalien (RPCMax) motsvarar eller överskrider 10 % av den positiva kontrollens respons i minst två av två eller två av tre testomgångar. Testkemikalien anses vara negativ om RPCMax inte uppnår minst 10 % av den positiva kontrollens respons i två av två eller två av tre testomgångar.44. Beräkningarna av PC10, PC50 och PCMax i ER-agonisttestet samt IC30 och IC50 i ER-antagonisttestet kan göras med hjälp av ett kalkylblad som finns tillgängligt tillsammans med testriktlinjen på OECD:s offentliga webbplats ([2]).

45. Det bör vara tillräckligt att erhålla värden för PC10 eller PC50 respektive IC30 eller IC50 minst två gånger. Om de resulterande basvärdena för data i samma koncentrationsintervall uppvisar variationer med en oacceptabelt hög variationskoefficient (CV, %) kan data anses otillförlitliga. I så fall bör källan till den höga variationen identifieras. Variationskoefficienten av rådatan är tre gånger så hög (dvs. Luminescensintensiteten för de datapunkter som används för beräkningen av PC10 bör vara lägre än 20 %.

46. Om acceptanskriterierna uppfylls innebär detta att testsystemet fungerar korrekt, men det säkerställer inte att en viss testomgång kommer att ge korrekta data. Att upprepa resultaten från den första testomgången är det bästa sättet att försäkra sig om att korrekta data har erhållits.

47. När det gäller ER-agonisttest, som kräver mer information utöver screening- och prioriteringsändamålen för denna testriktlinje för positiva testkemikalier, särskilt PC10-PC49-kemikalier och kemikalier som misstänks överstimulera luciferas, kan bekräftelse på att den observerade luciferasaktiviteten endast är en ERα-specifik respons fås med hjälp av en ERα-antagonist (se tillägg 2.1).

TESTRAPPORT

48. Se punkt 20 i ”Komponenter i ER TA-testet”.

LITTERATUR

(1) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 225), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(2) Escande A., et al. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1 459–1 469.

(3) Kuiper G.G., et al. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.,* 139, 4 252–4 263.

([2]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

(4) Spaepen M., et al. (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89–94.

(5) Kobayashi H., et al. (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769–771.

(6) Dussurget O. och Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl*. Environ. *Microbiol*., 60(3), 953–959.

(7) De Lean A., Munson P.J. och Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, Am. J. *Physiol*., 235, E97–El02.

Tillägg 2,1

FALSKT POSITIVT VÄRDE: BEDÖMNING AV EJ RECEPTORMEDIERADE LUMINESCENSSIGNALER

1. Falska positiva värden i ER-agonisttestet kan genereras av ej ER-medierad aktivering av luciferasgenen eller direkt aktivering av genprodukten eller orelaterad fluorescens. Sådana effekter visar sig genom en ofullständig eller ovanlig dosresponskurva. Om sådana effekter misstänks bör effekten av en ER-antagonist (t.ex. 4-hydroxitamoxifen (OHT) vid icke-toxisk koncentration) på responsen undersökas. Den rena antagonisten ICI 1827 80 är kanske inte lämplig för detta syfte eftersom en tillräcklig koncentration av ICI 1827 80 kan sänka VC-värdet, vilket i sin tur påverkar data-analysen.

2. För att säkerställa att detta tillvägagångssätt är giltigt måste följande testas i samma platta:

   — Den okända kemikaliens agonistiska aktivitet med/utan 10 μM OHT.

   — Vehikelkontroll (i triplikat).

   — OHT (i triplikat).

   — 1 nM av E2 (i triplikat) som agonistisk positiv kontroll.

   — 1 nM av E2 + OHT (i triplikat).

Datatolkningskriterier

Anmärkning: Samtliga hål bör behandlas med samma koncentration av vehikeln.

— Om den okända kemikaliens agonistiska aktivitet INTE påverkas av behandlingen med ER-antagonisten klassificeras den som ”negativ”.

— I fall där den okända kemikaliens agonistiska aktivitet hämmas fullständigt ska beslutskriterierna tillämpas.

— Om den agonistiska aktiviteten vid den lägsta koncentrationen motsvarar eller överskrider PC10-responsen hämmas den okända kemikalien i en grad som motsvarar eller överskrider PC10-responsen. Skillnaden i respons mellan de hål som inte har behandlats och de hål som har behandlats med ER-antagonisten beräknas. Denna skillnad bör anses motsvara den verkliga responsen och bör användas för beräkningen av lämpliga parametrar som underlag för ett klassificeringsbeslut.

Dataanalys

Kontrollera prestandastandarden.

Kontrollera variationskoefficienten mellan hål som behandlats under samma förhållanden.

1. Beräkna variationskoefficientens medelvärde.

2. Subtrahera variationskoefficientens medelvärde från värdet för varje hål som **inte** har behandlats med OHT.

3. Beräkna medelvärdet för OHT.

4. Subtrahera variationskoefficientens medelvärde från värdet för varje hål som har behandlats med OHT.

5. Beräkna den positiva kontrollens medelvärde.

6. Beräkna den relativa transkriptionella aktiviteten för alla andra hål i förhållandet till den positiva kontrollen.

Tillägg 2,2

BEREDNING AV SERUM BEHANDLAT MED DEXTRANBELAGT TRÄKOL (DCC)

1. Behandling av serum med dextranbelagt träkol (DCC) är en generell metod för att eliminera östrogenföreningar från serum som tillförs cellmedier. Syftet är att utesluta missvisande respons som är förknippad med östrogenrester i serumet. 500 ml fetalt bovinserum (FBS) kan behandlas genom detta förfarande.

Komponenter

2. Följande material och utrustning kommer att behövas:

Material

Aktivt träkol.

Dextran.

Magnesiumkloridhexahydrat (MgCl2·6H2O).

Sackaros.

1 M HEPES buffertlösning (pH 7.4).

Ultrarent vatten som producerats från ett filtersystem.

Utrustning

Autoklaverad glasbehållare (av lämplig storlek), en vanlig laboratoriecentrifug (som kan hålla en temperatur på 4 °C).

Förfarande

3. Följande förfarande har anpassats till användning av 50 ml centrifugprovrör:

[Dag-1] Bered en suspension av dextranbelagt träkol med 1 liter ultrarent vatten som innehåller 1,5 mM $MgCl_2$, 0,25 M sackaros, 2,5 g träkol, 0,25 g dextran och 5 mM HEPES, och rör om vid 4 °C över natten.

[Dag-2] Fördela suspensionen i 50 ml centrifugprovrör och centrifugera vid 10 000 rpm vid 4 °C i 10 minuter. Avlägsna supernatanten och lagra hälften av träkolssedimentet vid 4 °C för användning på dag-3. Suspendera den andra hälften av träkolet med FBS som har tinats något för att undvika fällning och värmeinaktiverats vid 56 °C i 30 minuter, överför sedan träkolet till en autoklaverad glasbehållare, t.ex. en E-kolv. Låt suspensionen stå under omrörning vid 4 °C över natten.

[Dag-3] Fördela suspensionen med FBS i centrifugprovrör för centrifugering vid 10 000 rpm vid 4 °C i 10 minuter. Samla in FBS och överför det till det nya träkolssediment som bereddes och lagrades på dag-2. Suspendera träkolssedimentet och låt suspensionen stå under försiktig omrörning i en autoklaverad glasbehållare vid 4 °C över natten.

[Dag-4] Fördela suspensionen för centrifugering vid 10 000 rpm vid 4 °C i 10 minuter och sterilisera supernatanten genom att filtrera den genom ett 0,2 µm sterilt filter. Denna DCC-behandlade FBS bör lagras vid −20 °C och kan användas i upp till ett år.

Tillägg 3

TESTMETOD MED TRANSAKTIVERING AV ÖSTROGENRECEPTORN VM7LUC FÖR IDENTIFIERING AV ÖSTROGENRECEPTORERS AGONISTER OCH ANTAGONISTER

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR (SE ÄVEN ALLMÄN INLEDNING)

1. Denna testmetod använder cellinjen VM7Luc4E2 ([1]). Den har validerats av *National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods* (NICEATM) och *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM) (1). VM7Luc-cellinjerna uttrycker framför allt endogena ERα och en mindre mängd endogent ERβ (2) (3) (4).

2. Denna metod är tillämplig på många olika ämnen, förutsatt att de är lösliga i dimetylsulfoxid (DMSO, CAS-nr 67-68-5), inte reagerar med DMSO eller cellodlingsmediet och inte är cytotoxiska vid de testade koncentrationerna. Om det inte är möjligt att använda DMSO kan en annan vehikel, såsom etanol eller vatten, användas i stället (se punkt 12). Den demonstrerade prestandan hos (ant)agonistmetoden VM7Luc ER TA tyder på att testet kan ge information om ER-medierade verkningssätt och att det kan övervägas i samband med prioritering av ämnen för ytterligare testning

3. Denna metod är särskilt utformad för att detektera hERα- och hERß-medierad transaktivering genom att mäta kemiluminiscens som endpoint. Det är vanligt att kemiluminiscens används i biologiska tester, eftersom luminiscens har ett högt signal-brusförhållande. Firefly-luciferasaktiviteten i cellbaserade tester kan dock förväxlas med ämnen som hämmar luciferasenzymet, vilket orsakar både en uppenbar inhibering eller ökad luminiscens på grund av proteinstabilisering. I vissa luciferasbaserade tester med ER-rapportgener har dessutom ej receptormedierade luminiscenssignaler rapporterats vid fytoöstrogena koncentrationer högre än 1 μM till följd av överaktivering av luciferasrapportgenen(9) (11). Dosresponskurvan visar att den faktiska aktiveringen av östrogenreceptorsystemet inträffar vid lägre koncentrationer, men det luciferasuttryck som erhålls vid höga koncentrationer av fytoöstrogener eller liknande föreningar som misstänks producera fytoöstrogenlik överaktivering av luciferasrapportgenen, måste undersökas noggrant i stabilt transfekterade ER TA-testsystem.

4. Avsnitten ”Allmän inledning” och ”Komponenter i ER TA-testet” bör läsas innan denna testmetod används för lagstadgade ändamål. Definitioner och förkortningar som används i denna testmetod beskrivs i tillägg 1.

PRINCIPER FÖR METODEN(SE ÄVEN ALLMÄN INLEDNING)

5. Metoden används för att indikera ligandbindning till östrogenreceptorer, följt av translokering av receptorligand-komplexet till kärnan. I kärnan binds receptor–ligand-komplexet till specifika DNA-responselement och transaktiverar rapportgenen (*luc*). Då produceras luciferas som sedan släpper ut ljus som kan kvantifieras med en luminometer. Luciferasaktivitet kan utvärderas snabbt och till låg kostnad med ett antal kommersiellt tillgängliga kit. VM7Luc ER TA använder VM7, en adenokarcinom cellinje från mänskligt bröst som är mottaglig för östrogenreceptorer, och har transfekterats stabilt med en firefly-*luc*-rapportgen under kontroll av fyra östrogenresponselement som har placerats uppströms från musens MMTV-promotor för att detektera ämnen med agonistisk eller antagonistisk aktivitet

([1]) Före juni 2016 betecknades denna cellinje som BG1Luc. BG-1-cellerna beskrevs först av Geisinger et al. (1998) (12), och karakteriserades senare av forskare vid National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (13). Relativt nyligen upptäckte man att det finns två olika varianter av BG-1-celler som används av forskare, BG-1 Fr och BG-1 NIEHS. En djupgående analys, inklusive DNA-testning, av dessa två varianter av cellinjen BG-1, som utfördes av Li och medarbetare (2014) (14), visade att BG-1 Fr är unik och att BG-1 NIEHS, dvs. den cellinje som ursprungligen användes för att utveckla metoden, inte är cellinjen BG1 från human äggstockscancer, utan i stället är en variant av cellinjen MCF7 från human bröstcance. Den cellinje som används i testet, som ursprungligen benämndes BG1Luc4E2 (15), kommer nu att betecknas som VM7Luc4E2 (”V” = variant, ”M7” = MCF7-celler). Analysen kommer nu att betecknas VM7Luc ER TA. Detta innebär visserligen ett ändrat ursprung för den cellinje som metoden bygger på, men det påverkar inte publicerade valideringsstudier eller nyttan med och tillämpningen av denna analys för screening av östrogena/anti-östrogena kemikalier.

in vitro i östrogenreceptorerna. Denna MMTV-promotor uppvisar endast smärre korsreaktivitet med andra steroida och icke-steroida hormoner (8). Datatolkningskriterierna beskrivs i detalj i punkt 41. Kortfattat identifieras positiv respons genom en koncentrationsresponskurva vid minst tre punkter, utan överlappande felstaplar (medelvärde ± SD), samt en förändring i omfånget (normaliserad relativ ljusenhet [*normalised relative light unit* RLU]) på minst 20 % av det maximala värdet för referensstandarden (17β-östradiol [E2; CAS-nr 50-28-2] för agonisttestet, raloxifen HCl [Ral, CAS-nr 84 449-90-1]/E2 för antagonisttestet).

FÖRFARANDE

Cellinje

6. Den stabilt transfekterade cellinjen VM7Luc4E2 bör användas i testet. Cellinjen finns för närvarande endast tillgänglig med ett tekniskt licensavtal från University of California, Davis, Kalifornien, USA ([2]) och från Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, North Carolina USA ([3]).

Cellinjens stabilitet

7. För att bibehålla cellinjens stabilitet och integritet bör cellerna odlas mer än en passage från den frysta stammen i cellunderhållsmediet (se punkt 9). Cellerna bör inte odlas mer än 30 passager. För cellinjen VM7Luc4E2 cell line tar 30 passager omkring tre månader.

Betingelser för cellodling och överföring till platta

8. De rutiner som anges i vägledningen om god praxis för cellodling (5) (6) bör följas för att säkerställa kvalitet hos alla material och metoder och på så sätt bibehålla arbetets integritet, giltighet och reproducerbarhet.

9. VM7Luc4E2-cellerna förvaras i ett RPMI 1 640-medium kompletterat med 0,9 % Pen-Strep och 8,0 % fetalt bovinserum (FBS) i en särskild vävnadsodlingsinkubator vid 37 ± 1 °C, 90 % ± 5 % luftfuktighet och 5,0 % ± 1 % CO_2/luft.

10. När VM7Luc4E2-cellerna når ~80 % konfluens subkultiveras och konditioneras de till en östrogenfri miljö i 48 timmar innan cellerna överförs till 96-hålsplattor för exponering för testkemikalierna och analys av östrogenberoende induktion av luciferasaktivitet. Det östrogenfria mediet (EFM) innehåller Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) utan fenolrött, kompletterat med 4,5 % träkols-/dextranbehandlat fetalt bovinserum (FBS), 1,9 % L-glutamin och 0,9 % Pen-Strep. Alla plastvaror bör vara fria från östrogenaktivitet [se detaljerat protokoll (7)].

Acceptanskriterier

11. Godkännandet eller förkastandet av ett test baseras på en utvärdering av referensstandarden och kontrollresultaten från varje försök, som utförts på en 96-hålsplatta. Varje referensstandard testas i flera koncentrationer och det ska finnas flera prov av varje referens- och kontrollkoncentration. Resultaten jämförs med kvalitetskontrollerna för dessa

([2]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, E: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649

([3]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, e-post: info@dioxins.com, tfn: 919-688-4804, fax: 919-688-4404

parametrar som härletts från de historiska databaser över agonistisk och antagonistisk aktivitet som varje laboratorium skapar när de visar sin kompetens. De historiska databaserna uppdateras kontinuerligt med värden för referensstandarden och kontrollerna. Ändringar i utrustning eller laboratorieförhållanden kan göra det nödvändigt att uppdatera de historiska databaserna.

Agonisttest

Förberedande test för att bestämma koncentrationsintervall

- Induktion: Plattornas induktion bör mätas genom att den genomsnittligt högsta E2-referensstandardens RLU-värde jämförs med det genomsnittliga RLU-värdet för DMSO-kontrollen. Femfaldig induktion uppnås vanligen, men för att godtas måste induktionen vara minst fyrfaldig.

- DMSO-kontrollresultat: Lösningsmedelskontrollens RLU-värden bör hålla sig inom 2,5 gånger standardavvikelsen för den historiska lösningskontrollens RLU-medelvärde.

- Försök som inte uppfyller ett av dessa acceptanskriterier bör förkastas och upprepas.

Fullständigt test

Det fullständiga testet innefattar acceptanskriterier för det förberedande agonisttestet samt följande:

- Resultat för referensstandarden: E2-referensstandardens koncentrationsresponskurva bör vara S-formad och uppvisa minst tre värden inom den linjära delen av koncentrationsresponskurvan.

- Resultat för positiva kontroller: Metoxiklorkontrollens RLU-värden bör vara högre än DMSO-medelvärdet, plus tre gånger standardavvikelsen från DMSO-medelvärdet.

- Försök som inte uppfyller ett av acceptanskriterierna bör förkastas och upprepas.

Antagonisttest

Förberedande test

- Reduktion: Plattornas reduktion mäts genom att den genomsnittligt högsta Ral/E2-referensstandardens RLU-värde jämförs med det genomsnittliga RLU-värdet för DMSO-kontrollen. Femfaldig reduktion uppnås vanligen, men för att godtas måste reduktionen vara minst trefaldig.

- E2-kontrollresultat. E2-kontrollens RLU-värden bör hålla sig inom 2,5 gånger standardavvikelsen för den historiska E2-kontrollens RLU-medelvärde.

- DMSO-kontrollresultat: DMSO-kontrollens RLU-värden bör hålla sig inom 2,5 gånger standardavvikelsen för den historiska lösningsmedelskontrollens RLU-medelvärde.

- Försök som inte uppfyller ett av acceptanskriterierna förkastas och upprepas.

Fullständigt test

Det fullständiga testet innefattar acceptanskriterier för det förberedande antagonisttestet samt följande:

- Resultat för referensstandarden: Ral/E2-referensstandardens koncentrationsresponskurva bör vara S-formad och uppvisa minst tre värden inom den linjära delen av koncentrationsresponskurvan.

- Resultat för positiva kontroller: RLU-värdena för tamoxifen-/E2-kontrollen bör vara lägre än E2-kontrollens medelvärde minus tre gånger standardavvikelsen från E2-kontrollens medelvärde.

- Försök som inte uppfyller ett av acceptanskriterierna förkastas och upprepas.

Referensstandarder, positiva kontroller och vehikelkontroller

Vehikelkontroll (agonist- och antagonisttest)

12. Den vehikel som används för att lösa upp testkemikalierna bör testas som vehikelkontroll. Den vehikel som användes under valideringen av VM7Luc ER TA-testet var 1 % (v/v) dimetylsulfoxid (DMSO, CAS-nr 67-68-5) (se punkt 24). Om en annan vehikel än DMSO används bör alla referensstandarder, kontroller och testkemikalier i förekommande fall testas i samma vehikel.

Referensstandard (förberedande agonisttest)

13. Referensstandarden är E2 (CAS-nr 50-28-2). För det förberedande testet består referensstandarden av en seriespädning med fyra koncentrationer av E2 (1,84 x 10^{-10}, 4,59 x 10^{-11}, 1,15 x 10^{-11} och 2,87 x 10^{-12} M), och varje koncentration testas i duplikathål.

Referensstandard (fullständigt agonisttest)

14. E2 för fullständig testning består av en seriespädning på 1:2 med elva koncentrationer (från 3,67 x 10^{-10} till 3,59 x 10^{-13} M) E2 i duplikathål.

Referensstandard (förberedande antagonisttest)

15. Referensstandarden är en kombination av Ral (CAS-nr 84 449-90-1) och E2 (CAS-nr 50-28-2). Ral/E2 för förberedande testning består av en seriespädning med tre koncentrationer av Ral (3,06 x 10^{-9}, 7,67 x 10^{-10} och 1,92 x 10^{-10}M), plus en fast koncentration (9,18 × 10-^{11} M) av E2 i duplikathål.

Referensstandard (fullständigt antagonisttest)

16. Ral/E2 för fullständig testning består av en seriespädning på 1:2 Ral (från 2,45x 10^{-8} till 9,57 x 10^{-11}M), plus en fast koncentration (9,18 × 10^{-11} M) av E2 bestående av nio koncentrationer av Ral/E2 i duplikathål.

Svag positiv kontroll (agonist)

17. Den svaga positiva kontrollen är 9,06 x 10^{-6} M *p,p'*-metoxiklor (metoxiklor, CAS-nr 72-43-5) i EFM).

Svag positiv kontroll (antagonist)

18. Den svaga positiva kontrollen består av tamoxifen (CAS-nr 10 540-29-1) 3.36 x 10^{-6} M med 9,18 × 10-^{11} M E2 i EFM.

E2-kontroll (endast antagonisttest)

19. E2-kontrollerna är 9,18 × 10^{-11} M E2 i EFM och används som en referens för negativ kontroll.

Induktionsförhållande (agonist)

20. Induktionen av referensstandardens (E2) luciferasaktivitet mäts genom att E2-referensstandardens högsta genomsnittliga RLU-värde divideras med DMSO-kontrollens genomsnittliga RLU-värde, och resultatet bör inte vara högre än fyrfaldigt.

Induktionsreduktion (antagonist)

21. Medelvärdet för referensstandardens (Ral/E2) luciferasaktivitet mäts genom att Ral/E2-referensstandardens högsta genomsnittliga RLU-värde divideras med DMSO-kontrollens genomsnittliga RLU-värde, och bör inte vara högre än trefaldigt.

Demonstration av laboratoriets kompetens (se punkt 14 och tabellerna 3 och 4 i ”Komponenter i ER TA-testet” i denna testmetod).

Vehikel

22. Testkemikalierna bör lösas upp i ett lämpligt lösningsmedel som är blandbart med cellmediet. Vatten, etanol (renhetsgrad 95 % till 100 %) och DMSO är lämpliga vehiklar. Om DMSO används bör nivån inte överskrida 1 % (v/v). För alla vehiklar ska det visas att den maximala volym som används inte är cytotoxisk och inte har en störande verkan på genomförandet av testet. Referensstandarderna och kontrollerna löses upp i 100 % lösningsmedel och späds därefter ned till lämpliga koncentrationer i EFM.

Beredning av testkemikalierna

23. Testkemikalierna löses upp i 100 % DMSO (eller lämpligt lösningsmedel) och späds därefter ned till lämpliga koncentrationer i EFM. Alla testkemikalier bör få anta rumstemperatur innan de löses upp och späds ut. Nya testkemikalielösningar bör beredas för varje försök. Lösningarna bör inte ha märkbara fällningar eller grumlighet. Referensstandarden och kontrollstammarna kan beredas i bulk. Nya beredningar av den slutliga referensstandarden, kontrollutspädningarna och testkemikalierna bör dock göras för varje försök och användas inom 24 timmar från beredningen.

Löslighet och cytotoxicitet: överväganden för koncentrationsintervalltest

24. Det förberedande testet består av sju-punkts 1:10 seriespädningar som körs i duplikat. Först testas testkemikalierna upp till den högsta koncentrationen på 1 mg/ml (~1 mM) för agonisttestet och 20 µg/ml (~10 µM) för antagonisttestet. Förberedande test används för att fastställa följande:

— Startkoncentrationer för testkemikalierna som ska användas under den fullständiga testningen

— Kemiska utspädningar för testkemikalierna (1:2 eller 1:5) som ska användas under den fullständiga testningen

25. En bedömning av cellviabilitet/cytotoxicitet ingår i protokollen för agonist- och antagonisttesterna (7) och integreras i de förberedande och fullständiga testerna. Den cytotoxicitetsmetod som användes för att bedöma cellviabilitet under valideringen av VM7Luc ER TA (1) var en skalad kvalitativ visuell observationsmetod. Det är dock även möjligt att använda en kvantitativ metod för att fastställa cytotoxicitet (se protokollet (7)). Data från testkemikaliekoncentrationer som orsakar mer än 20 % reduktion av viabiliteten kan inte användas.

Testkemikaliens exponering och beredning av testplattor

26. Cellerna räknas och överförs till 96-hålsplattor för vävnadsodling (2 x 10^5 celler per hål) i EFM och inkuberas i 24 timmar så att cellerna fäster vid plattan. EFM avlägsnas och ersätts med test- och referenskemikalierna i EFM och inkuberas i 19–24 timmar. Det är viktigt att vara särskilt försiktig med mycket flyktiga ämnen, eftersom närliggande kontrollhål kan skapa falska positiva resultat. I sådana fall kan användning av ”plattförseglare” bidra till att effektivt isolera individuella hål under testningen, och rekommenderas därför i dessa fall.

Förberedande tester för att bestämma koncentrationsintervall

27. Vid den förberedande testningen används alla hål i 96-hålsplattan för att testa kemikalier som sju-punkts 1:10 seriespädningar i duplikat (se figurerna 1 och 2).

— I den förberedande testningen av *agonister* används fyra koncentrationer av E2 i duplikat som referensstandard och fyra replikathål för DMSO-kontrollen.

— I den förberedande testningen av *antagonister* används tre koncentrationer av Ral/E2 med 9,18 × 10^{-11} M E2 i duplikat som referensstandard, med tre replikathål för E2- och DMSO-kontrollerna.

Figur 1

Utformning av förberedande agonisttest med 96-hålsplatta

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Förkortningar: E2-1 till E2-4 = koncentrationer av referensstandarden E2 (från hög till låg). TC1-1 till TC1-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 1 (TC1). TC2-1 till TC2-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 2 (TC2). TC3-1 till TC3-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 3 (TC3). TC4-1 till TC4-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 4 (TC4). TC5-1 till TC5-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 5 (TC5). TC6-1 till TC6-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 6 (TC6). VC = vehikelkontroll (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Figur 2

Utformning av förberedande antagonisttest med 96-hålsplatta

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Förkortningar: E2 = E2-kontroll. Ral-1 till Ral-3 = koncentrationer av referensstandarden raloxifen/E2 (från hög till låg). TC1-1 till TC1-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 1 (TC1). TC2-1 till TC2-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 2 (TC2). TC3-1 till TC3-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 3 (TC3). TC4-1 till TC4-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 4 (TC4). TC5-1 till TC5-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 5 (TC5). TC6-1 till TC6-7 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 6 (TC6). VC = vehikelkontroll (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Anmärkning: Alla testkemikalier testas i närvaro av 9,18 × 10-11 M E2.

28. Den rekommenderade slutliga volymen av medium som behövs för varje brunn är 200 µl. Använd endast testplattor där cellerna i alla hål ger en viabilitet på minst 80 %.

29. Fastställande av startkoncentrationer för fullständig ***agonist***-testning beskrivs i detalj i agonistprotokollet (7). Kortfattat används följande kriterier:

    — Om det inte finns några punkter på testkemikaliens kurva som är högre än medelvärdet plus tre gånger standardavvikelsen för DMSO-kontrollen görs ett fullständigt test med användning av elva-punkts 1:2 seriespädning, med den maximala lösliga koncentrationen som utgångspunkt.

    — Om det inte finns några punkter på testkemikaliens kurva som är högre än medelvärdet plus tre gånger standardavvikelsen för DMSO-kontrollen bör den startkoncentration som används för elva-punkts spädningsschemat i fullständig testning vara en log högre än den koncentration som ger det högsta justerade RLU-värdet i det förberedande koncentrationsintervalltestet. Elva-punktsschemat baseras antingen på en 1:2- eller 1:5-spädning enligt följande kriterier:

      En elva-punkts 1:2-seriespädning bör användas om det resulterande koncentrationsintervallet omfattar all respons baserat på den koncentrationsresponskurva som fåtts fram genom det förberedande testet. Annars bör en 1:5-spädning användas.

    — Om testkemikalien uppvisar en bifasisk koncentrationsresponskurva i det förberedande testet bör båda faserna även upplösas i den fullständiga testningen.

30. Fastställande av startkoncentrationer för fullständig ***antagonist***-testning beskrivs i detalj i antagonistprotokollet (7). Kortfattat används följande kriterier:

    — Om det inte finns några punkter på testkemikaliens koncentrationskurva som är lägre än medelvärdet minus tre gånger standardavvikelsen för E2-kontrollen görs ett fullständigt test med användning av elva-punkts 1:2 seriespädning, med den maximala lösliga koncentrationen som utgångspunkt.

— Om det inte finns några punkter på testkemikaliens kurva som är lägre än medelvärdet minus tre gånger standardavvikelsen för E2-kontrollen bör den startkoncentration som används för elva-punkts spädningsschemat i fullständig testning vara en av följande:

• Den koncentration som ger det lägsta justerade RLU-värdet i det förberedande testet.

• Den maximala lösliga koncentrationen (se antagonistprotokollet (7), figur 14-2).

• Den lägsta cytotoxiska koncentrationen (se relaterat exempel i antagonistprotokollet (7), figur 14-3).

— Elva-punktsschemat baseras antingen på en 1:2- eller 1:5-spädning enligt följande kriterier:

En elva-punkts 1:2-seriespädning bör användas om det resulterande koncentrationsintervallet omfattar all respons baserat på den koncentrationsresponskurva som fåtts fram genom det förberedande testet. Annars bör en 1:5-spädning användas.

Fullständiga tester

31. Det fullständiga testet består av elva-punkts seriespädningar (antingen 1:2- eller 1:5-seriespädningar baserat på startkoncentrationen för kriterierna för fullständig testning), där varje koncentration testas i tre hål i 96-hålsplattan (se figurerna 3 och 4).

— I den fullständiga testningen av *agonister* används elva koncentrationer av E2 i duplikat som referensstandard. Fyra replikathål för DMSO-kontrollen och fyra replikathål för metoxiklorkontrollen (9,06 x 10^{-6} M) finns med i varje platta.

— I den fullständiga testningen av *antagonister* används nio koncentrationer av Ral/E2 med 9,18 × 10^{-11} M E2 i duplikat som referensstandard, med fyra replikathål för E2-kontrollen med 9,18 x 10^{-11} M, fyra replikathål för DMSO-kontroller och fyra replikathål för tamoxifen 3,36 x 10^{-6}M.

Figur 3

Utformning av fullständigt test av agonister med en 96-hålsplatta

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

Förkortningar: TC1-1 till TC1-11 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 1. TC2-1 till TC2-11 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 2. E2-1 till E2-11 = koncentrationer av referensstandarden E2 (från hög till låg). Meth = p,p'-metoxiklor, svag positiv kontroll. VC = DMSO (1 % v/v) EFM vehikelkontroll.

Figur 4

Utformning av fullständigt test av antagonister med en 96-hålsplatta

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Förkortningar: E2 = E2-kontroll. Ral-1 till Ral-9 = koncentrationer av referensstandarden raloxifen/E2 (från hög till låg). Tam = tamoxifen/E2, svag positiv kontroll. TC1-1 till TC1-11 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 1 (TC1). TC2-1 till TC2-11 = koncentrationer (från hög till låg) av testkemikalie 2 (TC2). VC = vehikelkontroll (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Anmärkning: Såsom har påpekats innehåller alla referens- och testhål en fast koncentration av E2 (9,18 x 10-11M).

32. Upprepade fullständiga tester av samma kemikalie bör utföras på olika dagar för att säkerställa oberoende. Minst två fullständiga tester bör utföras. Om testresultaten motsäger varandra (t.ex. om ett test är positivt och det andra negativt) eller om ett av testerna är olämpligt bör ett ytterligare tredje test utföras.

Mätning av luminescens

33. Luminescens mäts i intervallet 300 till 650 nm med användning av en injektionsluminometer och programvara som kontrollerar injiceringsvolymen och mätintervallet (7). Ljusemissionen från varje hål uttrycks som RLU per hål.

DATAANALYS

Bestämning av EC_{50} /IC_{50}

34. EC_{50}-värdet (halva den maximala effektiva koncentrationen av testkemikalien [agonister]) och IC_{50}-värdet (halva den maximala hämmande koncentrationen av testkemikalien [antagonister]) fastställs utifrån koncentrationsresponsdata. För testkemikalier som är positiva vid en eller flera koncentrationer beräknas den koncentration av testkemikalien som orsakar halva den maximala responsen (IC_{50} eller EC_{50}) med hjälp av en Hillfunktionsanalys eller ett lämpligt alternativ. Hillfunktionen är en logistisk matematisk modell med fyra parametrar som kopplar testkemikaliekoncentrationen till responsen (som vanligen följer en S-kurva), med användning av nedanstående ekvation:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)Hill\ Slope}$$

Där

Y = respons (dvs. RLU-värden),

X = koncentrationens logaritm.

Bottom = lägsta respons.

Top = högsta respons.

lg EC_{50} (eller lg IC_{50}) = logaritmen för X som responsen halvvägs mellan topp och botten.

Hillslope = kurvans lutning.

Modellen beräknar den bästa passningen för parametrarna Top, Bottom, Hillslope samt IC_{50} och EC_{50}. Lämplig statistisk programvara bör användas för beräkningen av värdena för EC_{50} och IC_{50} (t.ex. den statistiska programvaran Graphpad Prism®).

Bestämning av avvikande värden (”outliers”)

35. En god statistisk bedömning kan underlättas genom att inbegripa (men inte begränsat till) Q-testet (se agonist- och antagonistprotokollen (7)) för att bestämma ”oanvändbara” hål som utesluts från dataanalysen.

36. För replikat av E2-referensstandarden (två per koncentration) betraktas alla justerade RLU-värden för ett replikat vid en given E2-koncentration som avvikande värden om dess värde ligger mer än 20 % över eller under det justerade RLU-värdet för den koncentrationen i den historiska databasen.

Insamling och justering av luminometerdata för förberedande koncentrationsintervalltestning

37. Rådata från luminometern bör överföras till en kalkylbladsmall som har utformats för testet. Det bör bestämmas om det finns datapunkter som visar avvikande värden som måste tas bort. (Se testacceptanskriterier för de parametrar som fastställs i analyserna.) Följande beräkningar bör göras:

Agonist

Steg 1 Beräkna medelvärdet för DMSO-vehikelkontrollen (VC).

Steg 2 Subtrahera medelvärdet för DMSO-vehikelkontrollen från varje hålvärde för att normalisera data.

Steg 3 Beräkna medelvärdet för referensstandardens induktionsförhållande (E2).

Steg 4 Beräkna medelvärdet för EC_{50}-värdet för testkemikalierna.

Antagonist

Steg 1 Beräkna medelvärdet för DMSO-vehikelkontrollen.

Steg 2 Subtrahera medelvärdet för DMSO-vehikelkontrollen från varje hålvärde för att normalisera data.

Steg 3 Beräkna medelvärdet för referensstandardens reduktionsförhållande (Ral/E2).

Steg 4 Beräkna medelvärdet för E2-referensstandarden.

Steg 5 Beräkna medelvärdet för IC50-värdet för testkemikalierna.

Insamling och justering av luminometerdata för fullständig testning

38. Rådata från luminometern bör överföras till en kalkylbladsmall som har utformats för testet. Det bör bestämmas om det finns datapunkter som visar avvikande värden som måste tas bort. (Se testacceptanskriterier för de parametrar som fastställs i analyserna.) Följande beräkningar görs:

Agonist

Steg 1 Beräkna medelvärdet för DMSO-vehikelkontrollen.

Steg 2 Subtrahera medelvärdet för DMSO-vehikelkontrollen från varje hålvärde för att normalisera data.

Steg 3 Beräkna medelvärdet för referensstandardens induktionsförhållande (E2).

Steg 4 Beräkna medelvärdet för EC_{50}-värdet för E2 och testkemikalierna.

Steg 5 Beräkna det justerade RLU-medelvärdet för metoxiklor.

Antagonist

Steg 1 Beräkna medelvärdet för DMSO-vehikelkontrollen.

Steg 2 Subtrahera medelvärdet för DMSO-vehikelkontrollen från varje hålvärde för att normalisera data.

Steg 3 Beräkna medelvärdet för referensstandardens induktionsförhållande (Ral/E2).

Steg 4 Beräkna medelvärdet för IC_{50}-värdet för Ral/E2 och testkemikalierna.

Steg 5 Beräkna det justerade RLU-medelvärdet för tamoxifen.

Steg 6 Beräkna medelvärdet för E2-referensstandarden.

Datatolkningskriterier

39. VM7Luc ER TA är avsett att ingå i en sammanvägd bedömning för att underlätta prioritering av ämnen för ED-testning in vivo. Ett led i detta prioriteringsförfarande är att klassificera testkemikalien som positiv eller negativ för antingen ER-agonistisk eller ER-antagonistisk aktivitet. De positiva och negativa beslutskriterier som används i valideringsstudien för VM7Luc ER TA beskrivs i tabell 1.

Tabell 1

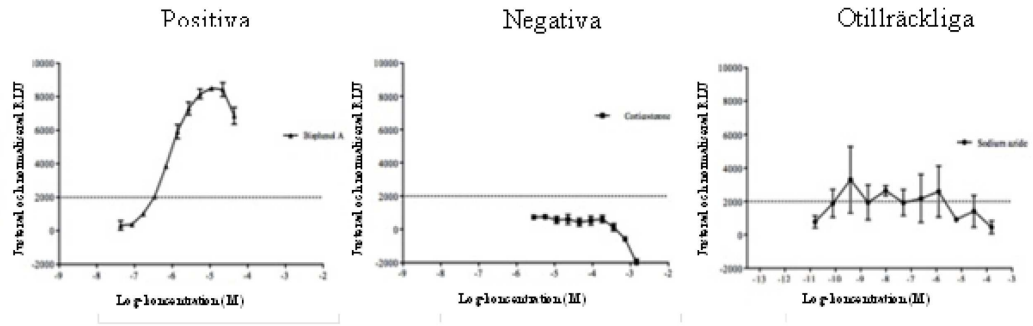
Positiva och negativa beslutskriterier

AGONISTISK AKTIVITET	
Positiv	— Alla testkemikalier som har klassificerats som *positiva för* ER-agonistisk aktivitet bör ha en koncentrationsresponskurva som består av en baslinje som följs av en positiv lutning och avslutas i en platå eller topp. I vissa fall är det endast möjligt att fastställa två av dessa egenskaper (baslinje–lutning eller lutning–topp). — Den linje som anger den positiva lutningen bör innehålla minst tre punkter med ej överlappande felstaplar (medelvärde ± SD). De punkter som formar baslinjen utesluts, men den linjära delen av kurvan kan omfatta toppen eller den första punkten i platån. — En positiv klassificering kräver en responsamplitud, skillnaden mellan baslinje och topp, på minst 20 % av det maximala värdet för referensstandarden E2 (dvs. 2 000 RLU eller mer när referensstandardernas [E2] värde justeras upp till 10 000 RLU). — Om möjligt bör ett EC_{50}-värde beräknas för varje positiv testkemikalie.
Negativ	Det genomsnittliga justerade RLU för en given koncentration motsvarar eller är lägre än RLU-medelvärdet för DMSO-kontrollen plus tre gånger standardavvikelsen för DMSO:s RLU.
Otillräcklig	Data som inte kan tolkas som att de visar närvaro eller avsaknad av aktivitet på grund av betydande kvalitativa eller kvantitativa begränsningar anses vara olämpliga, och kan inte användas för att fastställa om testkemikalien är positiv eller negativ. Kemikalierna bör omtestas.
ANTAGONISTISK AKTIVITET	
Positiv	— Testkemikaliens data skapar en koncentrationsresponskurva som består av en baslinje, följd av en negativ lutning. — Den linje som anger den negativa lutningen bör innehålla minst tre punkter med ej överlappande felstaplar. De punkter som formar baslinjen utesluts, men den linjära delen av kurvan kan omfatta den första punkten i platån. — Det bör finnas en reduktion på minst 20 % av aktiviteten jämfört med det maximala värdet för referensstandarden Ral/E2 (dvs. 8 000 RLU eller mindre när det maximala värdet för referensstandarden [Ral/E2] justeras till 10 000 RLU). — Testkemikaliens högsta icke-cytotoxiska koncentrationer bör vara lägre än eller motsvarande 1 x 10^{-5} M. — Om möjligt bör ett IC_{50}-värde beräknas för varje positiv testkemikalie.
Negativ	Alla datapunkter över EC_{80}-värdet (80 % av E2-responsen, eller 8 000 RLU), vid koncentrationer lägre än 1,0 x 10^{-5} M.
Otillräcklig	Data som inte kan tolkas som att de visar närvaro eller avsaknad av aktivitet på grund av betydande kvalitativa eller kvantitativa begränsningar anses vara olämpliga, och kan inte användas för att fastställa om testkemikalien är positiv eller negativ. Kemikalien bör omtestas.

40. Positiva resultat karakteriseras av både effektens omfattning och om så är möjligt den koncentration vid vilken effekten uppstår. Exempel på positiva, negativa och otillräckliga data visas i figurerna 5 och 6.

Figur 5

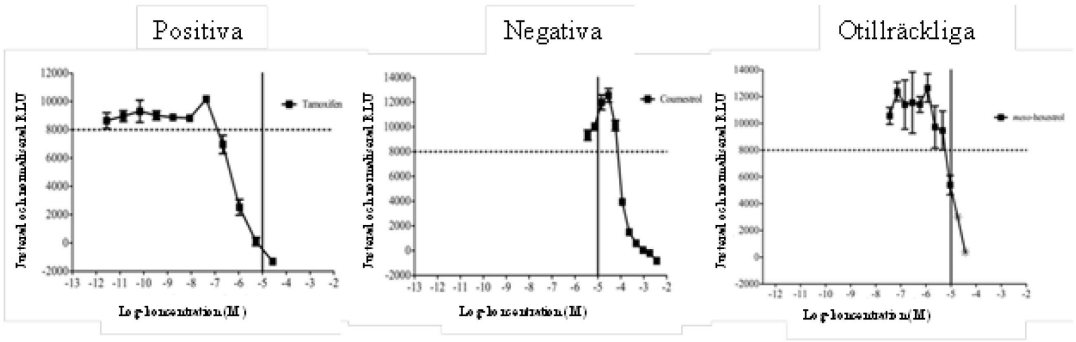
Exempel på agonister Positiva, negativa och otillräckliga data



Den streckade linjen anger 20 % av E2-responsen, 2 000 justerade och normaliserade RLU.

Figur 6

Exempel på antagonister Positiva, negativa och otillräckliga data



Den streckade linjen anger 80 % av Ral/E2-responsen, 8 000 justerade och normaliserade RLU.

Den heldragna linjen anger 1,00 x 10-5 M. För att en respons ska anses vara positiv bör den ligga under 8 000 RLU-linjen och vid koncentrationer lägre än 1,00 x 10-5M.

Koncentrationer märkta med en asterisk i meso-hexestroldiagrammet anger viabilitetspoäng på 2 eller högre.

Testresultaten för meso-hexestrol anses utgöra olämpliga data, eftersom den enda responsen under 8 000 RLU förekommer vid 1,00 x 10-5M.

41. Beräkningarna av EC_{50} och IC_{50} kan göras med hjälp av en Hillfunktion med fyra parametrar (se agonist- och antagonistprotokollen för närmare uppgifter (7)). Om acceptanskriterierna uppfylls innebär detta att systemet fungerar korrekt, men det säkerställer inte att en viss testomgång kommer att ge korrekta data. Att upprepa resultaten från den första testomgången är det bästa sättet att försäkra sig om att korrekta data har erhållits (se punkt19 i ”Komponenter i ER TA-testet”).

TESTRAPPORT

42. Se punkt 20 i ”Komponenter i ER TA-testet”.

LITTERATUR

(1) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, J. Cell Biochem., 82(3): 467-479.

(3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer Res., 58(23): 5 367-5 373.

(4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β, a Modulator of ERα in the Uterus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(11): 936-5 941.

(5) Balls M., et al. (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23 (Suppl): s. 270-273.

(6) Coecke S., et al. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: s. 261-287.

(7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication nr 11–7 850.

(8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* Mol. *Toxicol.*,13(1):67–82.

(9) Escande A., et al. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. *Pharmacol.*, 71(10):1 459–1 469.

(10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology,17(6): 646–657.

(11) Kuiper G.G., et al. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology,139(10):4 252–4 263.

(12) Geisinger, et al.(1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280–288.

(13) Baldwin, et.al. (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649–654.

(14) Li, Y., et al. (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, s. 2072–2081.

(15) Rogers, J.M. och Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors:development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenicand anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, s. 67-82.

Tillägg 4

STABILT TRANSFEKTERAD HUMAN ÖSTROGENRECEPTOR-A – TRANSAKTIVERINGSTEST FÖR DETEKTION AV ÖSTROGENAGONISTISK OCH -ANTAGONISTISK AKTIVITET HOS KEMIKALIER MED ANVÄNDNING AV CELLINJEN ERA CALUX

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR (SE ÄVEN ALLMÄN INLEDNING)

1. Denna ERα CALUX-transaktiveringstest använder den humana U2OS-cellinjen för att detektera östrogenagonistisk och -antagonistisk aktivitet, medierad genom human östrogenreceptor alfa (hERα). Valideringsstudien av det biologiska testet Stabilt transfekterad ERα CALUX, som utfördes av BioDetection Systems BV (Amsterdam, Nederländerna), visade att denna metod är relevant och tillförlitlig för det avsedda syftet (1). Cellinjen ERα CALUX uttrycker endast stabilt transfekterad human ERα (2) (3).

2. Denna metod är särskilt utformad för att detektera hERα-medierad transaktivering genom att mäta bioluminiscens som endpoint. Bioluminiscens används ofta i biologiska tester på grund av dess höga signal-brusförhållande (4).

3. Fytoöstrogenkoncentrationer högre än 1 μM har rapporterats överaktivera luciferasrapportgenen, vilket leder till ej receptormedierad luminescens (5) (6) (7). Högre koncentrationer av fytoöstrogener eller andra liknande föreningar som kan överaktivera luciferasuttrycket måste därför undersökas mycket noggrant i tester med stabilt transfekterad ER-transaktivering (se tillägg 2).

4. Avsnitten ”Allmän inledning” och ”Komponenter i ER TA-testet” bör läsas innan denna testmetod används för lagstadgade ändamål. Definitioner och förkortningar som används i denna testmetod beskrivs i tillägg 1.

PRINCIPER FÖR METODEN(SE ÄVEN ALLMÄN INLEDNING)

5. DET biologiska testet används för att bedöma ligandbindning till östrogenreceptorer, följt av translokering av receptor–ligand-komplexet till kärnan. I kärnan binder receptor–ligand-komplexet specifika DNA-responselement och transaktiverar en firefly-luciferasrapportgen, vilket leder till ökat celluttryck hos luciferasenzymen. Efter tillsats av luciferassubstratet luciferin omvandlas luciferinet till en bioluminiscent produkt. Det ljus som alstras kan enkelt upptäckas och kvantifieras med hjälp av en luminometer.

6. Testsystemet använder stabilt transfekterade ERα CALUX-celler. ERα CALUX-celler med ursprung från cellinjen U2OS från humant osteoblastiskt osteosarkom. Humana U2OS-celler transfekterades stabilt med 3xHRE-TATA-Luc och pSG5-neo-hERα, med användning av metoden för samfällning med kalciumfosfat. U2OS-cellinjen valdes som det den bästa kandidaten för att fungera som östrogenresponsiv (och andra steorida hormoner) rapportcellinje, baserat på iakttagelsen att U2OS-cellinjen uppvisar låg eller ingen endogen receptoraktivitet. Frånvaron av endogena receptorer bedömdes endast med användning av luciferasrapportplasmider, som inte visade någon aktivitet när receptorligander tillsattes. Denna cellinje stödde även starka hormonmedierade responser när kognata receptorer infördes transient (2) (3) (8).

7. Testningen av kemikaliers östrogena eller antiöstrogena aktivitet med hjälp av cellinjen ERα CALUX omfattar ett förberedande test och fullständiga testomgångar. Under den förberedande testet bestäms löslighet, cytotoxicitet och ett förfinat koncentrationsintervall för testkemikalierna inför den fullständiga testningen. Under de fullständiga testomgångarna testas testkemikaliernas förfinade koncentrationsintervall i ERα CALUX-testerna, för att därefter klassificera testkemikalierna som agonistiska eller antagonistiska.

8. Datatolkningskriterierna beskrivs i detalj i punkt 59. Kortfattat anses en testkemikalie vara positiv för agonistisk aktivitet om minst två på varandra följande koncentrationer av testkemikalien visar en respons som motsvarar eller är högre än 10 % av den maximala responsen för referensstandarden 17β-östradiol (PC_{10}). En testkemikalie anses vara positiv för antagonistisk aktivitet om minst två på varandra följande koncentrationer av testkemikalien visar en respons som motsvarar eller är lägre än 80 % av den maximala responsen för referensstandarden tamoxifen (PC_{80}).

FÖRFARANDE

Cellinjer

9. Den stabilt transfekterade cellinjen U2OS ERα CALUX bör användas i testet. Cellinjen kan erhållas från BioDetection Systems BV, Amsterdam, Nederländerna med ett tekniskt licensavtal.

10. Endast mykoplasmafria cellodlingar bör användas. De använda cellsatserna bör ha certifierats som negativa för mykoplasmaförorening. I annat fall bör ett mykoplasmatest utföras före användning. RT-PCR (*Real Time Polymerase Chain Reaktion*) bör användas för känslig detektion av mykoplasmainfektion (9).

Cellinjens stabilitet

11. För att bibehålla CALUX-cellernas stabilitet och integritet bör cellerna lagras i flytande kväve (–80 °C). När cellerna har tinats upp för att starta en ny odling bör de subkultiveras minst två gånger innan de används för att bedöma östrogenagonistisk och -antagonistisk aktivitet hos kemikalier. Cellerna bör inte subkultiveras för mer än 30 passager.

12. För att övervaka cellinjens stabilitet över tiden bör det agonistiska och antagonistiska testsystemets respons kontrolleras genom en utvärdering av referensstandardens värden EC_{50} eller IC_{50}. Dessutom bör det positiva och det negativa kontrollurvalets relativa induktion övervakas. Resultaten bör överensstämma med acceptanskriterierna för det agonistiska (tabell 3C) eller det antagonistiska ERα CALUX-biotestet (tabell 4C). Referensstandarder och positiva och negativa kontroller anges i tabellerna 1 och 2 för den agonistiska respektive antagonistiska varianten.

Betingelser för cellodling och överföring till platta

13. U2OS-cellerna bör odlas i ett odlingsmedium (DMEM/F12 (1:1) med fenolrött som pH-indikator, kompletterat med fetalt bovinserum (7,5 %), icke-essentiella aminosyror (1 %), 10 enheter/ml penicillin, streptomycin och geneticin (G-418) som urvalsmarkör). Cellerna bör placeras i en CO_2-inkubator (5 % CO_2) vid 37 °C och 100 % luftfuktighet. När cellerna når en konfluens på 85–95 % bör de antingen subkultiveras eller beredas för sådd i 96-håls mikrotiterplattor. I det senare fallet bör cellerna resuspenderas vid 1 x 10^5 celler/ml i ett östrogenfritt testmedium (DMEM/F12 (1:1) utan fenolrött, kompletterat med dextranbelagt träkol som behandlats med fetalt bovinserum (5 % v/v), icke-essentiella aminosyror (1 %) och 10 enheter/ml penicillin, streptomycin) och överföras till 96-hålsplattorna (100 µl homogeniserad cellsuspension). Cellerna bör förinkuberas i en CO_2-inkubator (5 % CO_2, 37 °C, 100 % luftfuktighet) i 24 timmar före exponering. Plasten bör vara östrogenfri.

Acceptanskriterier

14. Testkemikaliernas agonistiska och antagonistiska aktivitet testas i serier. En testserie består av högst sex mikrotiterplattor. Varje testserie består av minst en hel serie av utspädningar av en referensstandard, ett positivt kontrollprov, ett negativt kontrollprov och lösningsmedelskontroller. I figurerna 1 och 2 beskrivs beredningen av plattor för agonistiska och antagonistiska testserier.

15. Varje utspädning av referensstandarderna, testkemikalierna, alla lösningsmedelskontroller samt de positiva och negativa kontrollerna bör analyseras i triplikat. Varje triplikatanalys bör uppfylla kraven i tabellerna 3A och 4A.

16. En komplett serie av utspädningar av referensstandarden (17β-östradiol för agonistisk aktivitet, tamoxifen för antagonistisk aktivitet) mäts på den första plattan i varje testserie. För att kunna jämföra analysresultaten för de återstående fem mikrotiterplattorna med den första mikrotiterplattan som innehåller referensstandardens fullständiga koncentrationsresponskurva bör alla plattor innehålla tre kontrollprover: lösningsmedelskontroll, den högsta koncentrationen av den testade referensstandarden och approximativ koncentration av EC_{50} (agonistisk aktivitet) eller IC_{50} (antagonistisk aktivitet) för referensstandarden. Förhållandet mellan de genomsnittliga kontrollproverna för den första plattan och de återstående fem plattorna bör uppfylla de krav som anges i tabell 3C (agonistisk aktivitet) eller tabell 4C (antagonistisk aktivitet).

17. Z-faktorn beräknas för varje mikrotiterplatta inom en testserie (10). Z-faktorn bör beräknas med användning av responsen vid referensstandardens högsta och lägsta koncentration. En mikrotiterplatta anses giltig om den uppfyller kraven i tabell 3C (agonistisk aktivitet) eller tabell 4C (antagonistisk aktivitet).

18. Referensstandarden bör uppvisa en S-formad dosresponskurva. Det EC_{50}- eller IC_{50}-värde som härleds från responsen på en serie utspädningar av referensstandarden bör uppfylla kraven i tabell 3C (agonistisk aktivitet) eller tabell 4C (antagonistisk aktivitet).

19. Varje testserie bör innehålla ett positivt och ett negativt kontrollprov. Den beräknade relativa induktionen både för det positiva och det negativa kontrollprovet bör uppfylla kraven i tabell 3C (agonistisk aktivitet) eller tabell 4C (antagonistisk aktivitet).

20. Under alla mätningar bör induktionsfaktorn för referensstandardens högsta koncentration mätas genom att den genomsnittligt högsta RLU-responsen för referensstandarden 17β-östradiol divideras med referenslösningsmedelskontrollens genomsnittliga RLU-respons. Denna induktionsfaktor bör uppfylla kraven för x-faldig induktion i tabell 3C (agonistisk aktivitet) eller tabell 4C (antagonistisk aktivitet).

21. Endast mikrotiterplattor som uppfyller samtliga ovannämnda acceptanskriterier anses giltiga och kan användas för att utvärdera testkemikaliernas respons.

22. Acceptanskriterierna är tillämpliga både på det förberedande testet och de fullständiga testomgångarna.

Tabell 1

Koncentrationer av referensstandarden samt positiv kontroll och negativ kontroll för det agonistiska CALUX-testet

	Ämne	CAS-nr	Testintervall (M)
Referensstandard	17β-östradiol	50-28-2	$1*10^{-13}$ – $1*10^{-10}$
Positiv kontroll (PC)	17α-metyltestosteron	58-18-4	$3*10^{-6}$
Negativ kontroll (NC)	kortikosteron	50-22-6	$1*10^{-8}$

Tabell 2

Koncentrationer av referensstandarden samt positiv kontroll och negativ kontroll för det antagonistiska CALUX-testet

	Ämne	CAS-nr	Testintervall (M)
Referensstandard	tamoxifen	10540-29-1	$3*10^{-9}$ – $1*10^{-5}$
Positiv kontroll (PC)	4-hydroxitamoxifen	68047-06-3	$1*10^{-9}$
Negativ kontroll (NC)	resveratrol	501-36-0	$1*10^{-5}$

Tabell 3

Acceptanskriterier för det agonistiska ERα CALUX-testet

A – individuella prov på platta		**Kriterium**
1	Maximal % SD för triplikathål (för negativ kontroll, positiv kontroll, kemikalie och referensstandard, förutom C0)	< 15 %
2	Maximal % SD för triplikathål (för referensstandard och testkemikaliens lösningsmedelskontroller (C0, SC))	< 30 %
3	Maximalt LDH-läckage, som ett mått på cytotoxicitet.	< 120 %
B – inom en enskild mikrotiterplatta		
4	Förhållande för referensstandardens lösningsmedelskontroll (C0, platta 1) och testkemikaliens lösningsmedelskontroll (SC, plattorna 2 till x)	0,5 till 2,0
5	Förhållande för appr. EC50 och de högsta referensstandardkoncentrationerna på platta 1 samt appr. EC50 och de högsta referensstandardkoncentrationerna på plattorna 2 till x (C4, C8)	0,70 till 1,30
6	Z-faktor för varje platta	> 0,6
C – inom en enskild analysserie (samtliga plattor i en serie)		
7	S-kurva för referensstandarden	Ja (17ß-östradiol)
8	EC50-förhållande för referensstandarden 17ß-östradiol	$4*10^{-12}$ – $4*10^{-11}$ M
9	Minsta induktionsförhållande för den högsta koncentrationen av 17ß-östradiol med avseende på referensstandardens lösningsmedelskontroll.	5
10	Relativ induktion (%) PC.	> 30 %
11	Relativ induktion (%) NC.	< 10 %

Appr.: approximativ. PC: positiv kontroll. NC: negativ kontroll. SC: testkemikaliens lösningsmedelskontroll. C0: referensstandardens lösningsmedelskontroll. SD: standardavvikelse. LDH: laktatdehydrogenas.

Tabell 4

Acceptanskriterier för det antagonistiska ERα CALUX-testet

	A – individuella prov på platta	**Kriterium**
1	Maximal % SD för triplikathål (för negativ kontroll, positiv kontroll, kemikalie och referensstandard, lösningsmedelskontroll C0))	< 15 %
2	Maximal % SD för triplikathål (för vehikelkontroll och högsta referensstandardkoncentration (C8))	< 30 %
3	Maximalt LDH-läckage, som ett mått på cytotoxicitet.	< 120 %
	B – inom en enskild mikrotiterplatta	
4	Förhållande för referensstandardens lösningsmedelskontroll (C0, platta 1) och testkemikaliens lösningsmedelskontroll (SC, plattorna 2 till x)	0,70 till 1,30
5	Förhållande för appr. referensstandardkoncentrationer för IC50 på platta 1 samt appr. IC50-referensstandardkoncentrationer för IC50 på plattorna 2 till x (C4)	0,70 till 1,30
6	Förhållande för de högsta referensstandardkoncentrationerna på platta 1 och de högsta referensstandardkoncentrationerna på plattorna 2 till x (C8)	0,50 till 2,0
7	Z-faktor för varje platta	> 0,6
	C – inom en enskild analysserie (samtliga plattor i en serie)	
8	S-kurva för referensstandarden	Ja (tamoxifen)
9	IC50-förhållande för referensstandarden (tamoxifen)	$1*10^{-8}$ - $1*10^{-7}$ M
10	Minsta induktionsförhållande för referensstandardens lösningsmedelskontroll med avseende på den högsta tamoxifenkoncentrationen.	2,5
11	Relativ induktion (%) PC.	< 70 %
12	Relativ induktion (%) NC.	> 85 %

Appr.: approximativ. PC: positiv kontroll. NC: negativ kontroll. VC: vehikelkontroll (lösningsmedelskontroll utan fast koncentration av den agonistiska referensstandarden). SC: testkemikaliens lösningsmedelskontroll. C0: referensstandardens lösningsmedelskontroll. SD: standardavvikelse. LDH: laktatdehydrogenas.

Lösningsmedels-/vehikelkontroll, referensstandarder, positiva kontroller, negativa kontroller

23. Samma lösningsmedels-/vehikelkontroll, referensstandarder och positiva och negativa kontroller bör användas både för det förberedande testet och de fullständiga testomgångarna. Dessutom bör koncentrationen av referensstandarder och positiva och negativa kontroller vara desamma.

Lösningsmedelskontroll

24. Det lösningsmedel som används för att lösa upp testkemikalierna bör användas som lösningsmedelskontroll. Dimetylsulfoxid (DMSO, 1 % (v/v), CAS-nr 67-68-5) användes som vehikel under valideringen av ERα CALUX-testet. Om ett annat lösningsmedel än DMSO används bör alla referensstandarder, kontroller och testkemikalier testas i samma vehikel. Observera att lösningsmedelskontrollen för antagonistiska studier innehåller en fast koncentration av den agonistiska referensstandarden 17β-östradiol (ungefär EC_{50}-koncentration). En vehikelkontroll bör beredas och testas för att testa det lösningsmedel som används för antagonistiska studier.

Vehikelkontroll (antagonistisk aktivitet)

25. För att testa antagonistisk aktivitet kompletteras testmediet med en fast koncentration av den agonistiska referensstandarden 17β-östradiol (ungefär EC_{50}-koncentration). För att testa det lösningsmedel som använts för att lösa upp testkemikalierna i antagonisttestet, bör ett testmedium utan fast koncentration av den agonistiska referensstandarden 17β-östradiol beredas. Detta kontrollprov utgör vehikelkontrollen. Dimetylsulfoxid (DMSO, 1 % (v/v), CAS-nr 67-68-5) användes som vehikel under valideringen av ERα CALUX-testet. Om ett annat lösningsmedel än DMSO används bör alla referensstandarder, kontroller och testkemikalier testas i samma vehikel.

Referensstandarder

26. Den agonistiska referensstandarden är 17β-östradiol (tabell 1). Referensstandarderna består av seriespädningar av åtta koncentrationer av 17β-östradiol ($1*10^{-13}$, $3*10^{-13}$, $1*10^{-12}$, $3*10^{-12}$, $6*10^{-12}$, $1*10^{-11}$, $3*10^{-11}$, $1*10^{-10}$ M).

27. Den antagonistiska referensstandarden är tamoxifen (tabell 2). Referensstandarderna består av seriespädningar av åtta koncentrationer av tamoxifen ($3*10^{-9}$, $1*10^{-8}$, $3*10^{-8}$, $1*10^{-7}$, $3*10^{-7}$, $1*10^{-6}$, $3*10^{-6}$, $1*10^{-5}$ M). Varje koncentration av den agonistiska referensstandarden saminkuberas med en fast koncentration av den agonistiska referensstandarden17β-östradiol ($3*10^{-12}$ M).

Positiv kontroll

28. Den positiva kontrollen för agonistiska studier är 17α-metyltestosteron (tabell 1).

29. Den positiva kontrollen för antagonistiska studier är 4-hydroxitamoxifen (tabell 2). Den antagonistiska positiva kontrollen saminkuberas med en fast koncentration av den agonistiska referensstandarden17β-östradiol ($3*10^{-12}$ M).

Negativ kontroll

30. Den negativa kontrollen för agonistiska studier är kortikosteron (tabell 1).

31. Den negativa kontrollen för antagonistiska studier är resveratrol (tabell 2). Den antagonistiska negativa kontrollen saminkuberas med en fast koncentration av den agonistiska referensstandarden17β-östradiol ($3*10^{-12}$ M).

Demonstration av laboratoriets kompetens (se punkt 14 och tabellerna 3 och 4 i ”Komponenter i ER TA-testet” i denna testmetod)

Vehikel

32. Det lösningsmedel som används för att lösa upp testkemikalierna bör lösa upp testkemikalien fullständigt och bör vara blandbart med cellmediet. DMSO, vatten och etanol (renhetsgrad 95 % till 100 %) är lämpliga lösningsmedel. Om DMSO används som lösningsmedel bör den maximala koncentrationen av DMSO under inkubationen inte överskrida 1 % (v/v). Före användning bör lösningsmedlet testas för att kontrollera att det inte är cytotoxiskt och inte stör testet.

Beredning av referensstandarder, positiva kontroller, negativa kontroller och testkemikalier

33. Referensstandarder, positiva kontroller, negativa kontroller och testkemikalier löses upp i 100 % DMSO (eller ett annat lämpligt lösningsmedel). Lämpliga (serie)spädningar bör sedan beredas i samma lösningsmedel. Innan de löses upp bör alla ämnen få anta rumstemperatur. Färska stamlösningar eller referensstandarder, positiva kontroller, negativa kontroller och testkemikalier bör inte ha märkbara fällningar eller grumlighet. Referensstandarden och kontrollstammarna kan beredas i bulk. Nya stamlösningar av testkemikalierna bör beredas före varje försök. Nya slutliga utspädningar av referensstandarderna, de positiva kontrollerna, de negativa kontrollerna och testkemikalierna bör dock beredas för varje försök och användas inom 24 timmar från beredningen.

Löslighet, cytotoxicitet och koncentrationsintervall

34. Under det förberedande testet fastställs testkemikaliernas löslighet i det valda lösningsmedlet. En maximal stamkoncentration på 0,1 M bereds. Om denna koncentration visar löslighetsproblem bör lägre stamlösningar beredas till dess att testkemikalierna är fullständigt upplösta. Under det förberedande testet testas seriespädningar på 1:10 av testkemikalien. Den maximala testkoncentrationen för agonistisk eller antagonistisk testning är 1 mM. Efter det förberedande testet härleds ett lämpligt förfinat koncentrationsintervall för testkemikalierna som bör testas under de fullständiga testomgångarna. De utspädningar som används för fullständig testning bör vara 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x och 3000x.

35. Cytotoxicitetstestning ingår i protokollet för den agonistiska och den antagonistiska testmetoden (11). Cytotoxicitetstestning ingår dessutom både i det förberedande testet och de fullständiga testomgångarna. Den metod som användes för att bedöma cytotoxicitet under valideringen av ERα CALUX-testet var läckagetestet för laktatdehydrogenas (LDH) i kombination med en kvalitativ visuell inspektion av cellerna (se tillägg 4.1) och följt av exponering för textkemikalierna. Andra kvantitativa metoder kan dock användas för att bestämma cytotoxicitet (t.ex. tetrazoliumbaserat kolorimetriskt test (MTT) eller CALUX-test av cytotoxicitet). Generellt anses testkemikaliekoncentrationer som visar mer än 20 % reduktion av cellviabiliteten vara cytotoxiska och kan därför inte användas för datautvärdering. När det gäller LDH-läckagetest anses testkemikaliens koncentration vara cytotoxisk om procentandelen LDH-läckage är högre än 120 %.

Testkemikaliens exponering och beredning av testplattor

36. Efter trypsinering av en konfluent kolv med odlade celler resuspenderas cellerna vid 1 x 10^5 celler/ml i ett östrogenfritt testmedium 100 µl av resuspenderade celler överförs till de inre hålen på en 96-håls mikrotiterplatta. De yttre hålen fylls med 200 µl fosfatbuffrad saltlösning (PBS) (se figurerna 1 och 2). De överförda cellerna förinkuberas i 24 timmar i en CO_2-inkubator (5 % CO_2, 37 °C, 100 % luftfuktighet).

37. Efter förinkuberingen inspekteras cellerna för att kontrollera om det finns någon synlig cytotoxicitet (se tillägg 4.1), kontamination eller konfluens. Endast plattor som inte visar någon synlig cytotoxicitet eller kontamination och har minst 85 % konfluens används för testningen. Mediet från de inre hålen avlägsnas försiktigt och ersätts med 200 µl östrogenfritt testmedium som innehåller lämpliga spädningsserier av referensstandarderna, testkemikalierna, de

positiva kontrollerna, de negativa kontrollerna och lösningsmedelskontrollerna (tabell 5: agonistiska studier, Tabell 6: antagonistiska studier). Alla referensstandarder, testkemikalier, positiva kontroller, negativa kontroller och lösningsmedelskontroller testas i triplikat. Plattans utformning för agonistisk testning anges i figur 1. Plattans utformning för antagonistisk testning anges i figur 2. Plattorna för förberedande test och fullständig testning utformas på identiskt sätt. För antagonistisk testning innehåller alla inre hål, förutom hålen för vehikelkontroll, även en fast koncentration av den agonistiska referensstandarden 17β-östradiol ($3*10^{-12}$ M). Observera att referensstandarderna C8 och C4 bör tillsättas varje TC-platta.

38. När cellerna har exponerats för alla kemikalier bör de 96-håls mikrotiterplattorna inkuberas i ytterligare 24 timmar i en CO_2-inkubator (5 % CO_2, 37 °C, 100 % luftfuktighet).

Figur 1

Utformning av 96-håls mikrotiterplattor för förberedande test och bedömning av agonistisk effekt.

Platta 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Efterföljande plattor

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = referensstandardens lösningsmedel.

C(1-8) = referensstandardens spädningsserier (1-8, låga-till-höga koncentrationer).

PC = positiv kontroll.

NC = negativ kontroll.

TCx-(1-8) = spädningar (1-8, låga till höga koncentrationer) av testkemikalien för det förberedande testet samt bedömning av den agonistiska effekten hos testkemikalie x.

SC = lösningsmedelskontroll av testkemikalien (helst samma lösningsmedel som i C0, men eventuellt från en annan sats).

Grå celler: = Yttre hål, fyllda med 200 µl PBS.

Figur 2

Utformning av 96-håls mikrotiterplattor för förberedande test och bedömning av antagonistisk effekt.

Platta 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Efterföljande plattor

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = referensstandardens lösningsmedel.

C(1-8) = referensstandardens spädningsserier (1-8, låga-till-höga koncentrationer).

NC = negativ kontroll.

PC = positiv kontroll.

TCx-(1-8) = spädningar (1-8, låga till höga koncentrationer) av testkemikalien för det förberedande testet samt bedömning av den agonistiska effekten hos testkemikalie x.

SC = lösningsmedelskontroll av testkemikalien (helst samma lösningsmedel som i C0, men eventuellt från en annan sats).

VC = vehikelkontroll (lösningsmedelskontroll utan fast koncentration av den agonistiska referensstandarden 17β-östradiol).

Grå celler: = Yttre hål, fyllda med 200 µl PBS.

Anmärkning: alla inre hål, utom hålen för vehikelkontroll, innehåller också en fast koncentration av den agonistiska referensstandarden 17β-östradiol (3,0*10-12 M).

Mätning av luminescens

39. Luminiscensmätningen beskrivs i detalj i protokollet för den agonistiska och den antagonistiska testmetoden (10). Mediet bör avlägsnas från hålen och cellerna bör lyseras efter 24 timmars inkubation för att öppna cellmembranet och möjliggöra mätning av luciferasaktiviteten.

40. För luminescensmätningen kräver detta förfarande en luminometer som är utrustad med två injektorer. Luciferasreaktionen utlöses genom injektion av substratet luciferin. Reaktionen stoppas genom tillsats av 0,2 M NaOH. Reaktionen stoppas för att förebygga att luminescens överförs från ett hål till ett annat.

41. Det ljus som släpps ut från varje hål uttrycks som relativa ljusenheter (RLU) från varje hål.

Förberedande test

42. Analysresultaten från det förberedande testet används för att bestämma ett förfinat koncentrationsintervall för testkemikalierna inför den fullständiga testningen. Utvärdering av resultaten från det förberedande testet och bestämning av det förfinade koncentrationsintervallet för testkemikalier för fullständig testning beskrivs detaljerat i protokollet för den agonistiska och den antagonistiska testmetoden (10). Här ges endast en kort sammanfattning av förfarandena för att bestämma testkemikaliernas koncentrationsintervall för agonistisk och antagonistisk testning. Vägledning för utformningen av seriespädningar ges i tabellerna 5 och 6.

Val av koncentrationer för bedömning av agonistiska effekter

43. Under det förberedande testet bör testkemikalierna testas med användning av de seriespädningar som anges i tabell 5 (agonistisk testning) och 6 (antagonistisk testning). Alla koncentrationer bör testas i triplikathål enligt den utformning av plattorna som ges i figur 1 (agonistisk testning) respektive figur 2 (antagonistisk testning).

44. Endast analysresultat som uppfyller acceptanskriterierna (tabell 3) anses giltiga och kan användas för att utvärdera testkemikaliernas respons. Om en eller flera mikrotiterplattor i en analysserie inte uppfyller acceptanskriterierna bör de respektive mikrotiterplattorna analyseras igen. Om den första plattan som innehåller den fullständiga serien av spädningar av referensstandarden inte uppfyller acceptanskriterierna måste hela testserien (sex plattor) analyseras igen.

45. Testkemikaliernas ursprungliga koncentrationsintervall bör justeras och det förberedande testet bör upprepas i följande fall:

— Om cytotoxicitet observeras. Det förberedande testet bör upprepas med lägre icke-cytotoxiska koncentrationer av testkemikalien.

— Om det förberedande testet av testkemikalien inte visar en fullständig dosresponskurva på grund av att de testade kemikalierna genererar maximal induktion. Det förberedande testet bör upprepas med lägre koncentrationer av testkemikalien.

46. När en giltig dosrelaterad respons observeras bör den (lägsta) koncentration vid vilken maximal induktion observeras och inte visar cytotoxicitet väljas. Den högsta koncentrationen av den testkemikalie som ska testas i de fullständiga testomgångarna bör vara tre gånger denna valda koncentration.

47. En fullständig förfinad spädningsserie av testkemikalien bör beredas med de utspädningssteg som anges i tabell 5, med start vid den högsta koncentration som fastställts enligt ovan.

48. En testkemikalie som inte framkallar någon agonistisk effekt bör testas i de fullständiga testomgångarna, med start vid den högsta icke-cytotoxiska koncentration som identifierats under det förberedande testet.

Val av koncentrationer för bedömning av antagonistiska effekter

49. Endast analysresultat som uppfyller acceptanskriterierna (tabell 4) anses giltiga och kan användas för att utvärdera testkemikaliernas respons. Om en eller flera mikrotiterplattor i en analysserie inte uppfyller acceptanskriterierna bör de respektive mikrotiterplattorna analyseras igen. Om den första plattan som innehåller den fullständiga serien av spädningar av referensstandarden inte uppfyller acceptanskriterierna måste hela testserien (sex plattor) analyseras igen.

50. Testkemikaliernas ursprungliga koncentrationsintervall bör justeras och det förberedande testet bör upprepas i följande fall:

— Om cytotoxicitet observeras. Det förberedande testet bör upprepas med lägre icke-cytotoxiska koncentrationer av testkemikalien.

— Om det förberedande testet av testkemikalien inte visar en fullständig dosresponskurva på grund av att de testade kemikalierna genererar maximal inhibering. Det förberedande testet bör upprepas med lägre koncentrationer av testkemikalien.

51. När en giltig dosrelaterad respons påvisas bör den (lägsta) koncentration vid vilken maximal inhibiering observeras och inte visar cytotoxicitet väljas. Den högsta koncentrationen av den testkemikalie som ska testas i de fullständiga testomgångarna bör vara tre gånger denna valda koncentration.

52. En fullständig förfinad spädningsserie av testkemikalien bör beredas med de utspädningssteg som anges i tabell 6, med start vid den högsta koncentration som fastställts enligt ovan.

53. Testkemikalier som inte framkallar några antagonistisk effekter bör testas i de fullständiga testomgångarna, med start vid den högsta icke-cytotoxiska koncentration som testats under det förberedande testet.

Fullständiga testomgångar

54. När de förfinade koncentrationsintervallen har valts bör testkemikalierna testas fullständigt med användning av de spädningsserier som anges i tabell 5 (antagonistisk analys) och 6 (antagonistisk analys). Alla koncentrationer bör testas i triplikathål enligt den utformning av plattorna som ges i figur 1 (agonistisk testning) respektive figur 2 (antagonistisk testning).

55. Endast analysresultat som uppfyller acceptanskriterierna (tabellerna 3 och 4) anses giltiga och kan användas för att utvärdera testkemikaliernas respons. Om en eller flera mikrotiterplattor i en analysserie inte uppfyller acceptanskriterierna bör de respektive mikrotiterplattorna analyseras igen. Om den första plattan som innehåller den fullständiga serien av spädningar av referensstandarden inte uppfyller acceptanskriterierna måste hela testserien (sex plattor) analyseras igen.

Tabell 5

Koncentrationer och utspädningar av de referensstandarder, kontroller och testkemikalier som används för agonistisk testning

Referens 17β-östradiol		TCx – förberedande test		TCx – fullständig körning		Kontroller	
konc. (M)		utspädning		utspädning		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$3*10^{-6}$
C1	$1*10^{-13}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1*10^{-8}$
C2	$3*10^{-13}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$1*10^{-12}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$3*10^{-12}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$6*10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1*10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3*10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1*10^{-10}$						

TCx – testkemikalie x
PC – positiv kontroll (17α-metyltestosteron)
NC – negativ kontroll (kortikosteron)
C0 – referensstandardens lösningsmedelskontroll
SC – testkemikaliens lösningsmedelskontroll

Tabell 6

Koncentrationer och utspädningar av de referensstandarder, kontroller och testkemikalier som används för antagonistisk testning

Referenstamoxifen		TCx – förberedande test		TCx – fullständig körning		Kontroller	
konc. (M)		utspädning		utspädning		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$1*10^{-9}$
C1	$3*10^{-9}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1*10^{-5}$
C2	$1*10^{-8}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3*10^{-8}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1*10^{-7}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3*10^{-}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Kompletterad agonist**	
C6	$1*10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**konc. (M)**	
C7	$3*10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-östradiol	$3*10^{-12}$
C8	$1*10^{-5}$						

TCx – testkemikalie x
PC – positiv kontroll (4-hydroxitamoxifen)
NC – negativ kontroll (resveratrol)
C0 – referensstandardens lösningsmedelskontroll
SC – testkemikaliens lösningsmedelskontroll
VC – vehikelkontroll (innehåller ingen fast koncentration av den agonistiska referensstandarden 17β-östradiol ($3,0*10^{-12}$ M)

Insamling av data och dataanalys

56. Efter det förberedande testet och den fullständiga testomgångarna bör testkemikaliens EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50} och maximala induktion (TCx_{max}) bestämmas för agonistisk testning. För antagonistisk testning bör IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50} och minimal induktion (TCx_{min}) beräknas. En grafisk återgivning av dessa parametrar ges i figur 3 (agonistisk aktivitet) och figur 4 (antagonistisk aktivitet). De parametrar som behövs beräknas baserat på varje testkemikalies relativa induktion (i förhållande till referensstandardens maximala induktion (= 100 %)). Icke-linjär regression (variabel lutning, fyra parametrar) bör användas för datautvärderingen, enligt följande ekvation:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{(1 + 10^{((lgEC_{50} - X) \times Hill\ Slope)})}$$

Där

X = Log av dos eller koncentration

Y = Respons (relativ induktion (%))

Top = Maximal induktion (%)

Bottom = Minimal induktion (%)

$LogEC_{50}$ = log av koncentration vid vilken 50 % av den maximala responsen observeras.

Hill-koefficient (Hill slope) = lutningsfaktor eller Hill slope.

57. Rådata från luminometern, uttryckt som relativa ljusenheter (RLU), bör överföras till det kalkylblad för dataanalysen som har utformats för det förberedande testet och de fullständiga testomgångarna. Rådatan bör uppfylla de acceptanskriterier som anges i tabellerna 3A och 3B (agonistisk analys) respektive tabellerna 4A och 4B (antagonistisk analys). Om rådatan uppfyller acceptanskriterierna utförs följande beräkningssteg för att bestämma de parametrar som behövs:

Agonistisk analys

— Subtrahera genomsnittlig RLU för referensstandardens lösningsmedelskontroll från varje råanalysdata för referensstandarderna.

— Subtrahera genomsnittlig RLU för testkemikaliens lösningsmedelskontroll från varje råanalysdata för testkemikalierna.

— Beräkna den relativa induktionen från varje koncentration av referensstandarden. Sätt induktionen för den högsta koncentrationen av referensstandarden till 100 %.

— Beräkna den relativa induktionen för varje koncentration av testkemikalien jämfört med den högsta koncentrationen av referensstandarden som 100 %.

— Utvärdera analysresultaten enligt icke-linjär regression (variabel lutning, fyra parametrar).

— Bestäm EC_{50} och EC_{10} för referensstandarden.

— Bestäm EC_{50} och EC_{10} för testkemikalierna.

— Bestäm den högsta relativa induktionen för testkemikalien (TC_{max}).

— Bestäm PC_{10} och PC_{50} för testkemikalierna.

För testkemikalier är det kanske inte alltid möjligt att erhålla en fullständig dosresponskurva, t.ex. på grund av problem med cytotoxicitet eller löslighet. Det innebär i sin tur att EC_{50}, EC_{10} och PC_{50} inte kan bestämmas. I sådana fall kan endast PC_{10} och TC_{max} bestämmas.

Antagonistisk analys

— Subtrahera genomsnittlig RLU för den högsta koncentrationen av referensstandarden från varje råanalysdata för referensstandarderna.

— Subtrahera genomsnittlig RLU för referensstandardens lösningsmedelskontroll från varje råanalysdata för testkemikalierna.

— Beräkna den relativa induktionen från varje koncentration av referensstandarden. Sätt induktionen för den lägsta koncentrationen av referensstandarden till 100 %.

— Beräkna den relativa induktionen för varje koncentration av testkemikalien jämfört med den lägsta koncentrationen av referensstandarden som 100 %.

— Utvärdera analysresultaten enligt icke-linjär regression (variabel lutning, fyra parametrar).

— Bestäm IC_{50} och IC_{20} för referensstandarden.

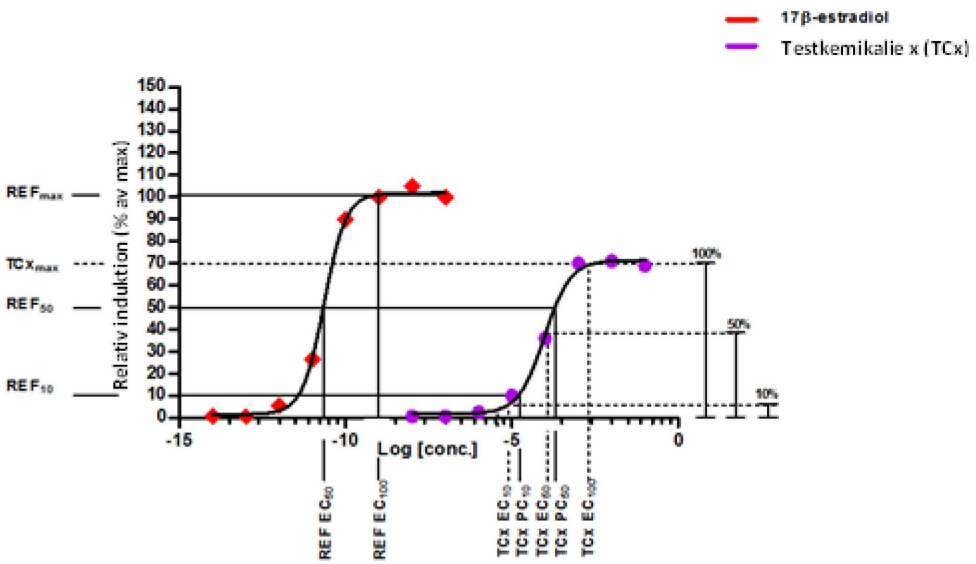
— Bestäm IC_{50} och IC_{20} för testkemikalierna.

— Bestäm den lägsta relativa induktionen för testkemikalien (TC_{min}).

— Bestäm PC_{80} och PC_{50} för testkemikalierna.

Figur 3

Översikt över parametrar som bestäms i det agonistiska testet



EC_{10} = koncentration av ett ämne vid vilken 10 % av dess maximala respons observeras.

EC_{50} = koncentration av ett ämne vid vilken 50 % av dess maximala respons observeras.

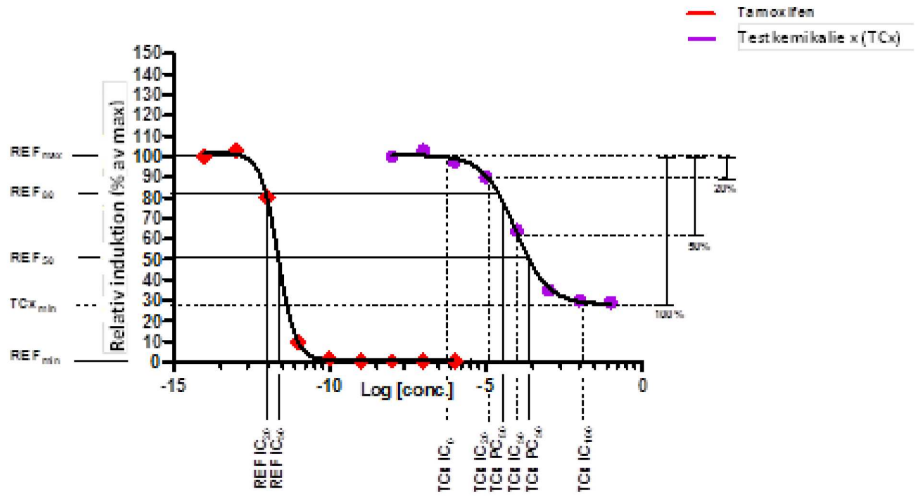
PC_{10} = koncentration av en testkemikalie vid vilken dess respons motsvarar referensstandardens EC_{10}.

PC_{50} = koncentration av en testkemikalie vid vilken dess respons motsvarar referensstandardens EC_{50}.

TCx_{max} = testkemikaliens maximala relativa induktion.

Figur 4

Översikt över parametrar som bestäms i det antagonistiska testet



IC20 = koncentration av ett ämne vid vilken 80 % av dess maximala respons observeras (20 % inhibition).

IC50 = koncentration av ett ämne vid vilken 50 % av dess maximala respons observeras (50 % inhibition).

PC80 = koncentration av en testkemikalie vid vilken dess respons motsvarar referensstandardens IC20.

PC50 = koncentration av en testkemikalie vid vilken dess respons motsvarar referensstandardens IC50.

TCxmin = testkemikaliens minimala relativa induktion.

För testkemikalier är det kanske inte alltid möjligt att erhålla en fullständig dosresponskurva, t.ex. på grund av problem med cytotoxicitet eller löslighet. Följaktligen kan IC_{50}, IC_{20} och PC_{50} inte fastställas. I sådana fall kan endast PC_{20} och TC_{min} bestämmas.

58. Resultaten bör baseras på två (eller tre) oberoende testomgångar. Om två testomgångar ger jämförbara och därför reproducerbara resultat är det inte nödvändigt att utföra en tredje testomgång. För att vara godtagbara bör resultaten

— uppfylla acceptanskriterierna (se Acceptanskriterier, punkterna 14–22),

— vara reproducerbara.

Datatolkningskriterier

59. Följande kriterier ska användas för datatolkning och beslut om huruvida en testkemikalie anses vara positiv eller negativ:

Agonistisk analys

För varje fullständig körning anses en testkemikalie vara **positiv** om

1 TC_{max} motsvarar eller överskrider 10 % av referensstandardens maximala respons (REF_{10}),

2 minst två på varandra följande koncentrationer av testkemikalien motsvarar eller överskrider REF_{10}.

För varje fullständig körning anses en testkemikalie vara **negativ** om

1 TCmax inte motsvarar eller överskrider 10 % av referensstandardens maximala respons (REF10).

2 mindre än två på varandra följande koncentrationer av testkemikalien motsvarar eller överskrider REF10.

Antagonistisk analys

För varje fullständig körning anses en testkemikalie vara **positiv** om

1 TCmin motsvarar eller är lägre än 80 % av referensstandardens maximala respons (REF80 = 20 % inhibition).

2 minst två på varandra följande koncentrationer av testkemikalien motsvarar eller är lägre än REF80.

För varje fullständig körning anses en testkemikalie vara **negativ** om

1 TCmin överskrider 80 % av referensstandardens maximala respons (REF80 = 20 % inhibition),

2 mindre än två på varandra följande koncentrationer av testkemikalien motsvarar eller är lägre än REF80.

60. För att karakterisera potensen hos den positiva responsen från en testkemikalie bör effektens omfattning (agonistisk analys TC_{max}, antagonistisk analys TC_{min}) samt den koncentration vid vilken effekten uppstår (agonistisk analys EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}. antagonistisk analys IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}) rapporteras.

TESTRAPPORT

61. Se punkt 20 i ”Komponenter i ER TA-testet”.

LITTERATUR

(1) OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ERα CALUX bioassay – transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 240). Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris

(2) Sonneveld E., Jansen H.J., Riteco J.A., Brouwer A., van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136–148.

(3) Quaedackers M.E., van den Brink C.E., Wissink S., Schreurs R.H.M.M., Gustafsson J.A., van der Saag P.T. och van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER)α and not through ERβ. *Endocrinology* 142(3), 1156–1166.

(4) Thorne N., Inglese J. och Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology17(6):646–57.

(5) Escande A., Pillon A., Servant N., Cravedi J.P., Larrea F., Muhn P., Nicolas J.C., Cavaillès V. och Balaguer P.. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459–1469.

(6) Kuiper G.G., Lemmen J.G., Carlsson B., Corton J.C., Safe S.H., van der Saag P.T., van der Burg B. och Gustafsson J.A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.,* 139, 4252–4263.

(7) Sotoca A.M., Bovee T.F.H., Brand W., Velikova N., Boeren S., Murk A.J., Vervoort J., Rietjens I.M.C.M. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.,* 122, 204–211.

(8) Sonneveld E., Riteco J.A.C., Jansen H.J., Pieterse B., Brouwer A., Schoonen W.G., and van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.,* 89(1), 173–187.

(9) Kobayashi H., Yamamoto K., Eguchi M., Kubo M., Nakagami S., Wakisaka S., Kaizuka M. och Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.,* 57(4), 769–771.

(10) Zhang J-H., Chung T.D.Y. och Oldenburg K.R. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays. J. Biomol. Scr., 4, 67–73

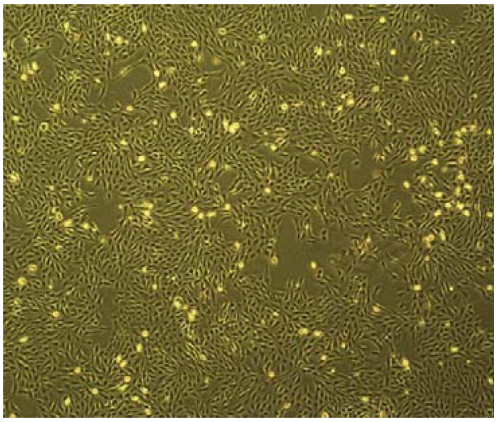
(11) Besselink H., Middelhof.I, och Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, Nederländerna,

Tillägg 4.1

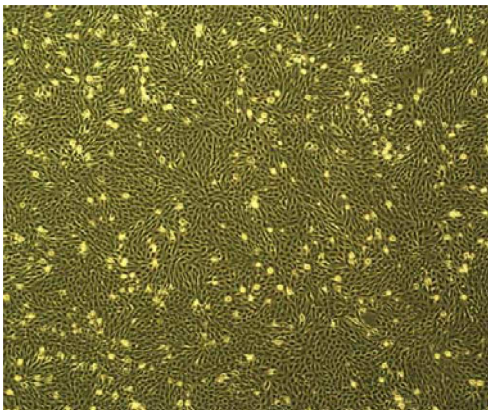
VISUELL INSPEKTION AV CELLVIABILITET



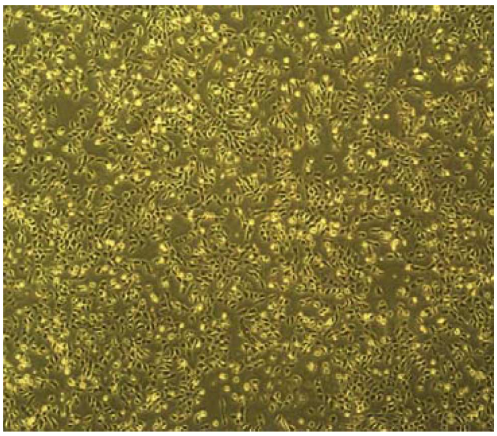
< 5 % konfluens. Cellerna har just såtts. 100 % cellviabilitet: Klassificering: ”ingen cytotoxicitet”



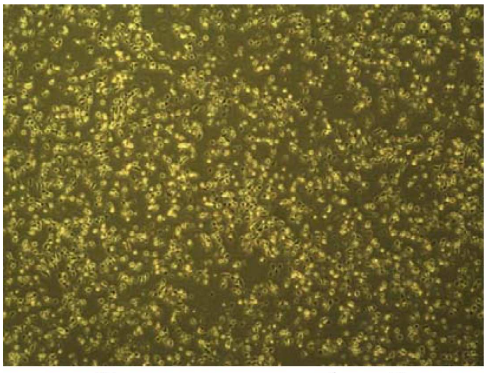
> 85 % konfluens. I detta skede exponeras cellerna för testkemikalier. > 95 % cellviabilitet. Klassificering: ”ingen cytotoxicitet”



> 95 % konfluens. Cellerna packas tätt och börjar växa över. > 95 % cellviabilitet. Klassificering: ”ingen cytotoxicitet”



< 25 % cellviabilitet. Cellerna släpper och kontakterna mellan dem minskar. Cellerna rundas. Klassificering: ”cytotoxicitet”



< 5 % cellviabilitet. Cellerna har släppt fullständigt och kontakten mellan dem bryts. Cellerna rundas. Klassificering: ”cytotoxicitet”

B.67 **TEST AV GENMUTATIONER HOS DÄGGDJURSCELLER IN VITRO MED ANVÄNDNING AV TYMIDINKINASGENEN**

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 490 (2016). Testmetoderna ses regelbundet över och revideras med avseende på den vetenskapliga utvecklingen, bestämmelser samt djurens välbefinnande. Muslymfomtestet (MLA) och TK6-testet med användning av tymidinkinaslokuset (TK) ingick ursprungligen i testmetod B.17. Därefter har MLA-expertarbetsgruppen vid International Workshop for Genotoxicity Testing (IWGT) utvecklat internationellt harmoniserade rekommendationer för acceptanskriterier och datatolkning för MLA (1)(2)(3)(4)(5), och dessa rekommendationer inbegrips i denna nya testmetod B.67. Denna testmetod är utformad för MLA, och även för TK6-testet, eftersom den använder TK-lokus. MLA har använts i stor utsträckning för lagstadgade ändamål, medan TK6 har använts betydligt mindre. Det bör noteras att trots likheterna mellan de två cellinjernas endpoints är de inte ömsesidigt utbytbara och de rättsliga systemen kan mycket väl föredra den ena cellinjen framför den andra för ett visst lagstadgat ändamål. Valideringen av MLA visade exempelvis att metoden inte bara är lämplig för att upptäcka genmutation, utan även en testkemikalies förmåga att inducera strukturell kromosomskada. Denna testmetod är en del av en serie av testmetoder för genetisk toxikologi. OECD har utarbetat ett dokument som ger kortfattad information om tester inom genetisk toxikologi och en översikt över de senaste ändringarna av OECD:s testriktlinjer inom detta område (6).

2. Syftet med genmutationstesterna för däggdjursceller in vitro är att upptäcka genmutationer som induceras av kemikalier. De cellinjer som används i dessa tester mäter framåtmutationer i rapportgener, särskilt den endogena tymidinkinasgenen (*TK* för celler från människa och *Tk* för celler från gnagare, i denna testmetod tillsammans kallade *TK*). Denna testmetod är avsedd för användning med två cellinjer: L5178Y $TK^{+/-}$–3.7.2C-muslymfomcellinjen (allmänt benämnd L5178Y) och TK6-lymfoblastoidceller från människa (allmänt benämnd TK6). Trots att de två cellinjerna varierar sinsemellan på grund av ursprung, celltillväxt, p53-status osv., kan *TK*-genmutationstester utföras på liknande sätt för båda celltyperna enligt beskrivningen i denna testmetod.

3. Tymidinkinasgenens autosomala och heterozygota karaktär möjliggör detektion av viabla kolonier vars celler saknar enzymet tymidinkinas efter mutation från $TK^{+/-}$ till $TK^{-/-}$. Denna brist kan vara följden av genetiska händelser som påverkar *TK*-genen, och det kan både röra sig om genmutationer (punktmutationer, läsramsmutationer, små deletioner osv.) och kromosomhändelser (stora deletioner, kromosomomlagringar och mitotisk rekombination). De senare händelserna uttrycks som en förlust av heterozygositet, som är en vanlig genetisk förändring hos tumörsuppressorgener i human tumorigenes. Teoretiskt sett kan en förlust av hela den kromosom som bär *TK*-genen till följd av försämring av kärnspolen och/eller mitotisk icke-disjunktion detekteras i MLA. En kombination av cytogenetisk och molekylär analys visar också tydligt att vissa MLA TK-mutanter är följden av icke-disjunktion. En sammanvägd bedömning visar dock att *TK*-genmutationstestet inte på ett tillförlitligt sätt kan detektera aneugener vid tillämpning av standardkriterier för cytotoxicitet (enligt beskrivningen i denna testmetod), och det är därför inte lämpligt att använda dessa tester för att detektera aneugener (7)(8)(9).

4. I *TK*-genmutationstester genereras två olika fenotypiska klasser av *TK*-mutanter: mutanter med normal tillväxt, som växer i samma takt som TK-heterozygota celler, och mutanter med långsam tillväxt, som växer med förlängda fördubblingstider. Mutanter med normal tillväxt och långsam tillväxt känns igen som stora och små kolonimutanter i MLA, och som tidigt och sent uppträdande kolonimutanter i TK6. Den molekylära och cytogenetiska naturen hos både stora och små kolonier av MLA-mutanter har undersökts mycket ingående (8) (10) (11) (12) (13). Den molekylära och cytogenetiska naturen hos tidigt och sent uppträdande TK6-mutanter har också undersökts i stor utsträckning (14) (15) (16) (17). Långsamt växande mutanter för båda celltyperna har lidit genetisk skada som involverar förmodat tillväxtreglerande gener nära *TK*-lokus, vilket leder till förlängda fördubblingstider och bildandet av sent uppträdande eller små kolonier (18). Induktion av mutanter med långsam tillväxt har associerats med kemikalier som inducerar omfattande strukturella förändringar på kromosomnivå. Celler vars skador inte involverar förmodat tillväxtreglerande gener nära TK-lokus växer i en liknande takt som de parentala cellerna och blir normalt växande mutanter. Induktion av huvudsakligen normalt växande mutanter associeras med kemikalier som främst agerar som punktmutagener. Följaktligen är det viktigt att räkna både långsamt och normalt växande mutanter för att återvinna alla mutanter och skapa insikt i de typer av skador (mutagener jämfört med klastogener) som induceras av testkemikalien (10) (12) (18) (19).

5. Testmetoden har utformats för att ge allmän information som gäller både MLA och TK6 samt specialiserad vägledning för de individuella testerna.

6. Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

7. Tester som utförs in vitro kräver i allmänhet att en exogen källa för metabolisk aktivering används. Det exogena metaboliska aktiveringssystemet efterliknar inte helt förhållandena in vivo.

8. Åtgärder bör vidtas för att undvika förhållanden som leder till artefaktiska positiva resultat (t.ex. möjlig interaktion med testsystemet) som inte orsakas av interaktion mellan testkemikalien och cellens genetiska material. Sådana förhållanden kan vara ändringar av pH eller osmolalitet, interaktion med mediets komponenter (20) (21) eller alltför hög cytotoxicitet (22)(23)(24). En cytotoxicitet som överskrider de rekommenderade maxnivåerna för cytotoxicitet enligt definitionen i avsnitt 28 anses vara för hög för MLA och TK6. Dessutom bör det noteras att testkemikalier som är tymidinanaloger eller beter sig som tymidinanaloger kan öka mutantfrekvensen genom selektiv tillväxt hos de spontana bakgrundsmutanterna under cellbehandling, vilket kräver ytterligare testmetoder för lämplig utvärdering (25).

9. Tillverkade nanomaterial kan kräva särskilda anpassningar av testmetoden, men de beskrivs inte här.

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

11. Muterade celler som saknar tymidinkinasenzymaktivitet beroende på mutationen $TK^{+/-}$ to $TK^{-/-}$, är resistenta mot de cytostatiska effekterna av pyrimidinanalogen trifluortymidin (TFT). Celler med fungerande tymidinkinas är känsliga för TFT, eftersom TFT orsakar inhibering av cellmetabolismen och stoppar fortsatt celldelning. Muterade celler kan således utvecklas i närvaro av TFT och bilda synliga kolonier, medan celler som innehåller TK-enzymet inte klarar detta.

TESTPRINCIP

12. Celler i suspension exponeras för testkemikalien, både med och utan metabolisk aktivering (se punkt 19), under en lämplig tidsperiod (se punkt 33) och subkultiveras för att bestämma cytotoxiciteten och för att tillåta fenotypisk expression innan mutanturvalet sker. Cytotoxicitet bestäms genom relativ total tillväxt (RTG – se punkt 25) för MLA och genom relativ överlevnad (RS – se punkt 26) för TK6. De behandlade kulturerna förvaras i tillväxtmedium under en tillräckligt lång tid, karakteristisk för varje celltyp (se punkt 37), för att tillåta i det närmaste optimal fenotypisk expression av inducerade mutationer. Efter fenotypisk expression bestäms mutantfrekvensen genom inokulering av ett känt antal celler i ett medium som innehåller det selektiva ämnet för detektion av mutantkolonier, och i ett medium utan selektivt ämne för bestämning av kloningseffektiviteten (viabiliteten). Efter en lämplig inkubationstid räknas kolonierna. Mutantfrekvensen räknas fram utifrån antalet mutantkolonier korrigerat för kloningseffektiviteten vid tidpunkten för mutanturvalet.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Beredningar

Celler

13. För MLA: Eftersom MLA utvecklades och karakteriserades med användning av sublinjen $TK^{+/-}$ −3.7.2C av L5178Y-celler måste denna specifika sublinje användas för MLA. L5178Y-cellinjen härleddes från ett metylkolantren-inducerat tymiskt lymfom från en DBA-2-mus (26). Clive och medarbetare behandlade L5178Y-celler (av Clive benämnda $TK^{+/+}$ −3) med etylmetansulfonat och isolerade en $TK^{-/-}$-klon (benämnd $TK^{-/-}$ −3.7) med bromdeoxiuridin som selektivt ämne. Från $TK^{-/-}$-klonen isolerades och karakteriserades en spontan $TK^{+/-}$-klon (benämnd $TK^{+/-}$ −3.7.2.) och

en subklon (benämnd som $TK^{+/-}$−3.7.2C) för användning i MLA (27). Karyotypen för cellinjen har publicerats (28)(29)(30)(31). Det modala kromosomantalet är 40. Det finns en metacentrisk kromosom (t12;13) som bör räknas som en kromosom. *TK*-lokus hos möss finns på den distala änden av kromosom 11. Cellinjen L5178Y $TK^{+/-}$ −3.7.2C har mutationer i båda p53-allelerna och producerar mutant-p53-protein (32) (33). p53-status för cellinjen $TK^{+/-}$−3.7.2C är sannolikt orsaken till att testet kan detektera storskalig skada (17).

14. För TK6: TK6 är en human lymfoblastoidcellinje. Den parentala cellinjen är cellinjen WI-L2 som transformerats med Epstein-Barr-virus, och som ursprungligen härleddes från en femårig pojke med hereditär sfärocytos. Den första isolerade klonen, HH4, mutageniserades med ICR191 och en *TK*-heterozygot cellinje, TK6, skapades (34). TK6-cellerna är nästan diploida och den representativa karyotypen är 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). *TK*-lokus hos människa finns på den långa armen av kromosom 17. TK6 är en p53-kompetent cellinje, eftersom den har en p53-sekvens av vildtyp i båda allelerna och endast uttrycker p53-protein av vildtyp (36).

15. För både MLA och TK6 gäller att när testlaboratoriet etablerar eller fyller på en mastercellstam bör det försäkra sig om frånvaro av mykoplasmakontamination , karyotypbestämma cellerna eller färga de kromosomer som hyser *TK*-lokus samt kontrollera populationernas fördubblingstider. Den normala cellcykeltiden för de celler som används i testlaboratoriet bör fastställas och bör överensstämma med kända cellegenskaper (16)(19)(37). Stamodlingen bör lagras vid −150 °C eller lägre och användas för att bereda alla arbetslösningar med celler.

16. Antingen innan ett stort antal nedfrysta stammar för användning etableras eller precis innan de används i ett försök, kan odlingen behöva rengöras av redan befintliga muterade celler (om inte lösningsmedelskontrollens mutantfrekvens [MF] redan ligger inom det godtagbara intervallet – se tabell 2 för MLA). Detta åstadkoms genom användning av metotrexat (aminopterin) för att selektera mot celler som saknar TK och tillföra tymidin, hypoxantin och glycin (L5178Y) eller 2'-deoxicytidin (TK6) till odlingen för att säkerställa optimal tillväxt hos de TK-kompetenta cellerna (19) (38) (39) samt (40) för TK6). Allmänna råd om god praxis för underhåll av cellodlingar och specifika råd för L5178Y- och TK6-celler finns i (19) (31) (37) (39) (41). För laboratorier som behöver mastercellstammar för att inleda antingen MLA eller TK6 eller för att erhålla nya mastercellstammar finns ett förråd med väl karakteriserade celler tillgängligt (37).

Medier och odlingsbetingelser

17. För båda testen bör lämpliga odlingsmedier och inkubationsförhållanden (odlingskärl, fuktad atmosfär med 5 % CO_2, inkubationstemperatur på 37 °C) väljas för odlingarna. Celler bör alltid odlas under förhållanden som garanterar en logfastillväxt. Det är särskilt viktigt att betingelserna för odlingarna väljs på ett sådant sätt att man säkrar en optimal celltillväxt under expressionsperioden och kloning för både muterade celler och icke-muterade celler. För MLA och TK6 är det också viktigt att odlingsförhållandena säkerställer optimal tillväxt hos både stora kolonier av/tidigt uppträdande TK-mutanter och små kolonier av/sent uppträdande TK-mutanter. Närmare information om odlingsförhållanden, inklusive behovet av att värmeinaktivera hästserum om RPMI-medium används under mutanturvalet, finns i (19) (31) (38) (39) (40) (42).

Beredning av odlingarna

18. Cellerna dras upp från stamodlingar som är sådda i ett odlingsmedium som har en sådan densitet att suspensionsodlingarna fortsätter att växa exponentiellt genom behandlings- och expressionsperioderna.

Metabolisk aktivering

19. Exogena metaboliserande system bör användas när L5178Y- och TK6-cellerna inte har tillräcklig endogen metabolisk kapacitet. Det mest använda systemet, som rekommenderas som standard om inte annat kan motiveras, är en kofaktorstödd postmitokondriell fraktion (S9) som beretts av lever från gnagare (vanligen råttor) som behandlats med enzyminducerande ämnen, t.ex. Aroclor 1254 (43) (44) (45) eller en kombination av fenobarbital och β-naftoflavon (46) (47) (48) (49) (50) (51). Den senare kombinationen bryter inte mot Stockholmskonventionen

om långlivade organiska föroreningar (52) och har visat sig vara lika effektiv som Aroclor 1254 när det gäller att inducera multifunktionsoxidaser (”mixed-function oxidases”) (45)(46)(47)(48)(49). S9-fraktionen används vanligen i koncentrationer mellan 1–2 volymprocent men kan ökas till 10 volymprocent i det slutliga testmediet. Valet av typ och koncentration av använt exogent metaboliskt aktiveringssystem eller metabolisk induktion kan påverkas av klassen av testkemikalier.

Beredning av testkemikalien

20. Fasta testkemikalier bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och vid behov spädas ut innan cellerna behandlas (se punkt 21). Flytande testkemikalier kan tillsättas direkt till testsystemet och/eller spädas ut före behandling av testsystemet. Gaser eller flyktiga testkemikalier bör testas genom lämpliga modifikationer av standardprotokollen, såsom behandling i slutna odlingskärl (53) (54) (55). Testkemikalien bör beredas strax innan behandling om inte stabilitetsdata visar att lagringen är acceptabel.

TESTBETINGELSER

Lösningsmedel

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

MÄTNING AV CYTOTOXICITET OCH VAL AV BEHANDLINGSKONCENTRATIONER

22. Vid bestämning av maximal testkemikaliekoncentration bör man undvika koncentrationer som kan ge artefaktiska positiva resultat, t.ex. sådana som medför alltför kraftig cytotoxicitet (se punkt 28), fällning i odlingsmediet (se punkt 29) eller betydande ändringar av pH eller osmolalitet (se punkt 8). Om testkemikalien orsakar en betydande ändring av mediets pH vid tillsättningen kan pH justeras genom buffring av det slutliga behandlingsmediet för att undvika artefaktiska positiva resultat och upprätthålla lämpliga odlingsförhållanden.

23. Valet av koncentrationer baseras på cytotoxicitet och andra överväganden (se punkterna 27-30). Även om det kan vara användbart att utvärdera cytotoxicitet i ett inledande test för att bättre definiera de koncentrationer som ska användas i huvudförsöket är ett inledande test inte obligatoriskt. Även om en inledande cytotoxicitetsbedömning görs måste cytotoxiciteten för varje odling mätas i huvudexperimentet. Om ett förberedande test görs bör det täcka ett stort koncentrationsintervall och kan antingen avslutas på dag 1 efter behandling eller fortsätta genom expressionsperioden på två dagar fram till mutanturvalet (om det står klart att de använda koncentrationerna är lämpliga).

24. Cytotoxicitet bör fastställas för varje individuell test- och kontrollodling: metoderna för MLA (2) och TK6 (15) definieras genom internationellt vedertagen praxis.

25. För både agar- och mikrotiterversionerna av MLA: Cytotoxicitet bör utvärderas med användning av relativ total tillväxt (RTG), som ursprungligen definierades av Clive och Spector 1975 (2). Detta mått omfattar relativ suspensionstillväxt (RSG: testodling jämfört med lösningsmedelskontroll) under cellbehandling, expressionstiden samt relativ kloningseffektivitet (RCE: testodling jämfört med lösningsmedelskontroll) vid den tidpunkt då mutanterna väljs (2). Det bör noteras att RSG innefattar eventuell cellförlust som förekommer i testodlingen under behandling (formeln anges i tillägg 2).

26. För TK6: Cytotoxicitet bör bedömas genom användning av relativ överlevnad (RS), dvs. kloningseffektiviteten för celler som överförts till platta omedelbart efter behandling, och justeras utifrån eventuell cellförlust under behandlingen samt baseras på antal celler jämfört med den negativa kontrollen (som tilldelas en överlevnadskvot på 100 %) (se tillägg 2 för formeln).

27. Minst tre testkoncentrationer (exklusive lösningsmedel och positiva kontroller) som uppfyller acceptanskriterierna (lämplig cytotoxicitet, antal celler osv.) bör utvärderas. Även om användning av duplikat är att föredra kan både replikat och enskilt behandlade odlingar användas för varje koncentration som testas. De resultat som erhölls för replikatodlingarna vid en given koncentration kan slås ihop för dataanalysen (55). För testkemikalier med låg eller ingen cytotoxicitet är två- till trefaldiga koncentrationsintervall vanligen lämpliga. Om testkemikalien är cytotoxisk bör testkoncentrationerna väljas så att de täcker ett intervall för cytotoxiciteten enligt beskrivningen i punkt 28 och omfatta koncentrationer med måttlig, låg eller ingen cytotoxicitet. Många testkemikalier uppvisar koncentrationsresponskurvor. För att täcka in alla grader av cytotoxicitet eller undersöka koncentrationsresponsen i detalj kan det vara nödvändigt att använda koncentrationer som ligger närmare varandra och fler än fyra koncentrationer, i synnerhet i situationer där försöket måste upprepas (se punkt 70). Användning av mer än fyra koncentrationer kan vara särskilt viktigt vid användande av enstaka odlingar.

28. Om den maximala koncentrationen baseras på cytotoxicitet bör den högsta koncentrationen syfta till att uppnå mellan 20 och 10 % relativ total tillväxt (RTG) för MLA, och mellan 20 och 10 % relativ överlevnad (RS) för TK6 (punkt 67).

29. För svårlösliga testkemikalier som inte är cytotoxiska vid koncentrationer som är lägre än den lägsta olösliga koncentrationen bör den högsta analyserade koncentrationen framkalla grumlighet eller en fällning som är synlig med blotta ögat eller med hjälp av ett inverterat mikroskop vid slutet av behandlingen med testkemikalien. Även om cytotoxicitet förekommer över den lägsta olösliga koncentrationen är det lämpligt att testa endast en koncentration som producerar grumlighet eller har en synlig fällning, eftersom fällningen kan ge artefaktiska effekter. MLA ochTK6 använder suspensionsodlingar, och det är därför viktigt att noggrant se till att fällningen inte stör testet. Bestämning av löslighet i odlingsmediet före försöket kan också vara användbart.

30. Om ingen fällning eller begränsande cytotoxicitet observeras ska de högsta testkoncentrationerna motsvara det lägsta av följande värden: 10 mM, 2 mg/ml eller 2 µl/ml (57) (58). Om testkemikalien inte har en definierad sammansättning, t.ex. ett ämne med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiskt material (dvs. UVCB-ämnen), miljöextrakt osv., kan man behöva använda en högre toppkoncentration (t.ex. 5 mg/ml) om cytotoxiciteten inte är tillräckligt hög, så att koncentrationen av varje komponent ökas. Det bör dock noteras att dessa krav kan skilja sig för humanläkemedel (59).

Kontroller

31. Parallella negativa kontroller (se punkt 21), bestående av enbart lösningsmedel i behandlingsmediet, och hanterade på samma sätt som behandlingsodlingarna, bör inkluderas för varje testbetingelse.

32. Parallella positiva kontroller behövs för att visa laboratoriets förmåga att identifiera mutagener enligt villkoren i det använda testprotokollet och, i förekommande fall, effektiviteten hos det exogena systemet för metabolisk aktivering, och för att visa adekvat detektion både av små/sent uppträdande och stora/tidigt uppträdande *TK*-mutanter. Exempel på positiva kontroller ges i tabell 1 nedan. Alternativa positiva kontrollämnen kan användas om det är motiverat. In vitro-tester av däggdjursceller med avseende på genetisk toxicitet är tillräckligt standardiserade för kortvariga behandlingar (3–4 timmar) som görs parallellt med och utan metabolisk aktivering med samma behandlingslängd. Användningen av positiva kontroller kan därför begränsas till en mutagen som kräver metabolisk aktivering. I detta fall visar en enda positiv kontrollrespons både aktiviteten hos det metaboliska aktiveringssystemet och testsystemets känslighet. Separata positiva kontroller bör dock göras av långvariga behandlingar (dvs. 24 timmar utan S9) om sådana används, eftersom behandlingstiden skiljer sig från testet med metabolisk aktivering. Varje positiv kontroll bör användas för en eller flera koncentrationer som förväntas ge ökningar över bakgrunden som går att reproducera och detektera. Syftet med detta är att visa testsystemets sensitivitet , och responsen får inte äventyras av cytotoxicitet som överskrider de gränser som anges i denna testmetod (se punkt 28).

Tabell 1

Rekommenderade referensämnen för utvärdering av laboratoriets kompetens och för val av positiva kontroller

Kategori	Ämne	CAS-nr
1. Mutagener utan metabolisk aktivering		
	Metylmetansulfonat	66-27-3
	Mitomycin C	50-07-7
	4-nitrokinolin-N-oxid	56-57-5
2. Mutagener som kräver metabolisk aktivering		
	Benso(a)pyren	50-32-8
	Cyklofosfamid (monohydrat)	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-dimetylbenzantracen	57-97-6
	3-metylkolantren	56-49-5

FÖRFARANDE

Behandling med testkemikalien

33. Prolifererande celler behandlas med testkemikalien i såväl närvaro som frånvaro av ett system för metabolisk aktivering. Exponering bör ske under en lämplig tidsperiod (normalt är 3 till 4 timmar tillräckligt). Det bör dock noteras att dessa krav kan skilja sig för humanläkemedel (59). I fall där den kortsiktiga behandlingen ger negativa resultat för MLA och det finns information som tyder på att det krävs en längre behandling [t.ex. nukleosida analoger, svårlösliga kemikalier (5)(59)], bör man överväga att utföra testet med längre behandling, dvs. 24 timmar utan S9.

34. Minimiantalet celler som används i varje testodling (kontrollodlingar och behandlade odlingar) för varje etapp i testet bör baseras på den spontana mutantfrekvensen. En generell regel är att behandla och ympa om ett tillräckligt antal celler i varje försöksodling för att bibehålla minst 10 men helst 100 spontana mutanter i alla faser av testet (behandling, fenotypiskt uttryck och mutanturval) (56).

35. För MLA är den rekommenderade godtagbara spontana mutantfrekvensen 35–140 × 10^{-6} (agarversionen) och 50–170 × 10^{-6} (mikrotiterversionen) (se tabell 2). För att minst 10 och helst 100 spontana mutanter ska överleva behandlingen för varje testodling är det nödvändigt att behandla minst 6 × 10^{6} celler. Om detta antal celler behandlas och ett tillräckligt antal celler bibehålls under expressionsperioden och kloningen för mutanturvalet, ger det ett tillräckligt antal spontana mutanter (tio eller fler) under alla faser i försöket, även för de odlingar som behandlas vid koncentrationer som leder till 90 % cytotoxicitet (mätt med en RTG på 10 %) (19)(38)(39).

36. För TK6 brukar den spontana mutantfrekvensen ligga på mellan 2 och 10 × 10^{-6}. För att minst 10 spontana mutanter ska överleva behandlingen för varje odling är det nödvändigt att behandla minst 20 × 10^{6} celler. Om detta antal celler behandlas erhålls ett tillräckligt antal spontana mutanter (tio eller fler), även för de odlingar som behandlas vid koncentrationer som leder till 90 % cytotoxicitet under behandling (10 % RS). Dessutom måste ett tillräckligt stort antal celler odlas fram under expressionsperioden och överföras till platta för mutanturvalet (60).

Fenotypisk expressionstid och mätning av cytotoxicitet och mutantfrekvens

37. I slutet av behandlingsperioden odlas celler under en fastställd tidsperiod så att nära optimal fenotypisk expression av nyligen inducerade mutanter medges, som är specifik för varje cellinje. För MLA är den fenotypiska expressionstiden två dagar. För TK6 är den fenotypiska expressionstiden tre till fyra dagar. Om 24-timmarsbehandling används inleds expressionstiden när behandlingen har avslutats.

38. Under den fenotypiska expressionsperioden räknas cellerna dagligen. För MLA används den dagliga cellräkningen för att beräkna den dagliga suspensionstillväxten (SG). Efter den två dagar långa expressionsperioden suspenderas cellerna i ett medium med eller utan selektivt ämne för bestämning av antalet mutanter (urvalsplattor) respektive kloningseffektivitet (viabilitetsplattor). För MLA finns det två lika godtagbara metoder för kloning av mutanturvalet: i den ena metoden används mjuk agar och i den andra ett flytande medium i 96-hålsplattor (19) (38) (39). Kloningen i TK6 utförs med ett flytande medium och 96-hålsplattor (16).

39. Trifluortymidin (TFT) är det enda rekommenderade selektiva ämnet för *TK*-mutanter (61).

40. För MLA räknas agarplattor och mikrotiterplattor efter 10–12 dagars inkubation. Vad beträffar TK6 räknas kolonierna i mikrotiterplattorna efter 10–14 för de tidigt uppträdande mutanterna. För att återvinna långsamt växande (sent uppträdande) TK6-mutanter är det nödvändigt att återigen tillföra cellerna tillväxtmedium och TFT efter räkningen av tidigt uppträdande mutanter och därefter inkubera plattorna i ytterligare 7–10 dagar (62). Räkningen av långsamt och normalt växande *TK*-mutanter diskuteras i punkterna 42 och 44.

41. Lämpliga beräkningar för de två testerna inklusive de två metoderna (agar och mikrotiterplatta) för MLA anges i tillägg 2. När det gäller agarmetoden för MLA räknas kolonierna och antalet mutantkolonier justeras med kloningseffektiviteten för att beräkna en mutantfrekvens. Vad gäller mikrotiterversionen för MLA och TK6 bestäms kloningseffektiviteten för både urvals- och kloningseffektivitetsplattorna enligt Poissonfördelningen (63). Mutantfrekvensen beräknas utifrån dessa två kloningseffektivitetsvärden.

Karakterisering av mutantkolonier

42. För MLA bör, om testkemikalien är positiv (se punkterna 62–63), karakteriseringen av kolonier genom kolonistorlek eller tillväxt utföras på minst en av testodlingarna (vanligen den högsta godtagbara positiva koncentrationen) och på de negativa och positiva kontrollerna. Om testkemikalien är negativ (se punkt 64) bör karakteriseringen av mutantkolonier utföras på de negativa och positiva kontrollerna. I mikrotitermetoden för MLA definieras små kolonimutanter som sådana som täcker mindre än 25 % av hålets diameter, och stora kolonimutanter som sådana som täcker mer än 25 % av hålets diameter. För agarmetoden används en automatisk koloniräknare för att räkna mutantkolonierna och bestämma kolonistorlek. Metoder för storleksbestämning av kolonier anges i litteraturen (19) (38) (40). Karakterisering av kolonier för den negativa och positiva kontrollen är nödvändig för att visa att studierna utförs på lämpligt sätt.

43. Testkemikalien kan inte bestämmas som negativ om varken de stora eller de små kolonimutanterna detekteras korrekt i den positiva kontrollen. Kolonikarakterisering kan användas för att tillhandahålla allmän information om testkemikaliens förmåga att orsaka punktmutationer och/eller kromosomhändelser (punkt 4).

44. TK6: Normalt växande och långsamt växande mutanter differentieras genom en skillnad i inkubationstid (se punkt 40). För TK6 räknas vanligen både de tidigt och de sent uppträdande mutanterna för samtliga odlingar, inklusive de negativa och positiva kontrollerna. Karakterisering av kolonier för den negativa och positiva kontrollen är nödvändig för att visa att studierna utförs på lämpligt sätt. Testkemikalien kan inte bestämmas som negativ om varken de tidigt eller de sent uppträdande mutanterna detekteras korrekt i den positiva kontrollen. Kolonikarakterisering kan användas för att tillhandahålla allmän information om testkemikaliens förmåga att orsaka punktmutationer och/eller kromosomhändelser (punkt 4).

Laboratoriets kompetens

45. För att visa att det finns tillräcklig erfarenhet av testet innan det används för rutintestning bör laboratoriet ha utfört en serie försök med positiva referensämnen som agerar via olika mekanismer (minst ett som är aktivt med och ett som är aktivt utan metabolisk aktivering, valt från kemikalierna i tabell 1) och flera negativa kontroller (inklusive obehandlade odlingar och olika lösningsmedel/vehiklar). Dessa positiva och negativa kontrollresponser bör överensstämma med litteraturen. Detta gäller inte laboratorier som redan har erfarenhet, dvs. har en sådan historisk databas som beskrivs i punkterna 47–50. För MLA bör de värden som erhålls för både positiva och negativa kontroller överensstämma med IWGT-rekommendationerna (se tabell 2).

46. Ett urval av positiva kontrollämnen (se tabell 1) bör undersökas med korta och långa behandlingstider (om långa behandlingstider används) utan metabolisk aktivering, och även med kort behandlingstid med metabolisk aktivering, för att visa att det har kompetens att upptäcka mutagena kemikalier, bestämma effektiviteten hos det metaboliska aktiveringssystemet och visa att det råder lämpliga förhållanden för celltillväxt under behandling, fenotypisk expression och mutanturval samt att räkningsförfarandena är lämpliga. En serie koncentrationer av de valda ämnena bör användas för att ge reproducerbara och koncentrationsrelaterade ökningar över bakgrunden i syfte att visa testsystemets sensitivitet och dynamiska omfång.

Historiska kontrolldata

47. Laboratoriet bör fastställa följande:

— Historiskt positivt kontrollintervall samt fördelning.

— Historiskt negativt (obehandlad, lösningsmedel) kontrollintervall samt fördelning.

48. Om data för en historisk negativ kontrollfördelning samlas in först bör de parallella negativa kontrollerna överensstämma med publicerade data för negativa kontroller. Allteftersom kontrollfördelningen kompletteras med fler försöksdata bör de parallella negativa kontrollerna företrädesvis ligga inom fördelningens kontrollgräns på 95 % (64) (65).

49. Laboratoriets historiska databas för negativa kontroller bör inledningsvis baseras på minst 10 försök, men bör helst bygga på minst 20 försök som utförts under jämförbara testbetingelser. Laboratorierna bör använda kvalitetskontrollmetoder såsom kontrolldiagram (t.ex. C-diagram eller X-stapeldiagram (65)), för att fastställa hur variabla deras positiva och negativa kontrolldata är och för att visa att metoden är ”under kontroll” i deras laboratorium (66). Närmare anvisningar och rekommendationer om hur man bygger upp och använder de historiska data finns i litteraturen (64).

50. Negativ kontrolldata bör bestå av mutantfrekvenser från enstaka eller helst replikata odlingar enligt beskrivningen i punkt 27. Parallella negativa kontroller bör helst ligga inom kontrollgränsen på 95 % för fördelningen av laboratoriets historiska negativa kontrolldatabas. Om negativa kontrolldata faller utanför kontrollgränsen på 95 % kan de ändå ingå i den historiska kontrollfördelningen så länge de inte är extremt avvikande och det finns bevis för att testsystemet är under kontroll (se punkt 49) och att inga tekniska eller mänskliga fel förekommit.

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

DATA OCH RAPPORTERING

Presentation av resultaten

52. Presentationen av data för både MLA och TK6 bör, för både behandlade odlingar och kontrollodlingar, innefatta de data som krävs för beräkning av cytotoxicitet (relativ total tillväxt respektive relativ överlevnad) och mutantfrekvenser, enligt beskrivningen nedan.

53. För MLA bör data för enskilda odlingar lämnas för relativ suspensionstillväxt, relativ total tillväxt, kloningseffektivitet vid tidpunkten för mutanturvalet samt antal mutantkolonier (för agarversionen) eller antal tomma hål (för mikrotiterversionen). Mutantfrekvensen bör uttryckas som antalet muterade celler per miljon överlevande celler. Om responsen är positiv bör mutantfrekvensen för små och stora kolonier (och/eller procentandelen av den totala mutantfrekvensen) anges för minst en koncentration av testkemikalien (vanligen den högsta positiva koncentrationen) samt de negativa och positiva kontrollerna. I händelse av negativ respons bör mutantfrekvensen för små och stora kolonier anges för den negativa och den positiva kontrollen.

54. För TK6 bör data för enskilda odlingar anges för relativ överlevnad, kloningseffektivitet vid tidpunkten för mutanturvalet samt antalet tomma hål för tidigt och sent uppträdande mutanter. Mutantfrekvensen bör uttryckas som antalet muterade celler per antalet överlevande celler, och bör inbegripa den totala mutantfrekvensen och mutantfrekvensen (och eller procentandelen av den totala mutantfrekvensen) för tidigt och sent uppträdande mutanter.

Acceptanskriterier

55. Följande kriterier bör uppfyllas för både MLA och TK6 innan de övergripande resultaten bestäms för en specifik testkemikalie:

— Två olika testbetingelser (dvs kort behandlingstid med och utan metabolisk aktivering – se punkt 33) har tillämpats om inte ett av dem gav positiva resultat.

— Tillräckligt många celler och koncentrationer bör finnas tillgängliga för analys (se punkterna 27 och 34–36).

— Urvalskriterierna för toppkoncentrationen överensstämmer med de kriterier som beskrivs i punkterna 28–30.

Acceptanskriterier för negativa och positiva kontroller

56. IWGT:s expertarbetsgrupp för MLA genomförde en analys av en stor mängd MLA-data, som ledde till internationell enighet om specifika acceptanskriterier för MLA (1)(2)(3)(4)(5). Denna testmetod innehåller därför särskilda rekommendationer för att fastställa om negativa och positiva kontroller kan godtas och för utvärdering av enskilda ämnesresultat i MLA. TK6 har en mycket mindre databas och har inte utvärderats av en arbetsgrupp.

57. För MLA bör varje försök utvärderas för att se om den obehandlade kontrollen/lösningsmedelskontrollen uppfyller IWGT MLA-arbetsgruppens acceptanskriterier ((4) och tabell 2 nedan) för 1) mutantfrekvens (observera att de mutantfrekvenser som IWGT anser vara godtagbara skiljer sig åt för agar- och mikrotiterversionerna av MLA), 2) kloningseffektivitet vid tidpunkten för mutanturvalet, och 3) suspensionstillväxt för lösningsmedelskontrollen (formeln anges i tillägg 2).

Tabell 2

Acceptanskriterier för MLA

Parameter	Mjukagarmetod	Mikrotitermetod
Mutantfrekvens	35–140 × 10^{-6}	50–170 × 10^{-6}
Kloningseffektivitet	65–120 %	65–120 %
Suspensionstillväxt	8–32-faldig (3–4 timmars behandling) 32–180-faldig (24 timmars behandling, om den utförs)	8–32-faldig (3–4 timmars behandling) 32–180-faldig (24 timmars behandling, om den utförs)

58. För MLA bör varje test även utvärderas för att se om de positiva kontrollerna uppfyller minst en av följande två acceptanskriterier som har tagits fram av IWGT-arbetsgruppen:

— Den positiva kontrollen bör uppvisa en absolut ökning i total mutantfrekvens, dvs. en ökning över den spontana bakgrundsmutantfrekvensen (inducerad mutantfrekvens [IMF]) på minst 300×10^{-6}. Minst 40 % av IMF bör avspeglas i mutantfrekvensen för små kolonier.

— Den positiva kontrollen ska uppvisa en ökning av mutantfrekvensen i små kolonier på minst 150×10^{-6} över den frekvens som observeras i den parallella obehandlade/lösningsmedelskontrollen (en IMF i små kolonier på 150×10^{-6}).

59. För TK6 är ett test godtagbart om den parallella negativa kontrollen anses godtagbar för registrering i laboratoriets historiska databas över negativa kontroller enligt punkterna 48–49. Parallella positiva kontroller (se punkt 32) bör dessutom framkalla reaktioner som överensstämmer med de kontroller som genereras i den historiska databasen över positiva kontroller och ge en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.

60. För båda testerna bör den övre cytotoxicitetsgräns som observerats i den positiva kontrollodlingen vara densamma som för försökskulturerna, dvs. relativ total tillväxt/relativ överlevnad (RTG/RS) bör inte vara lägre än 10 %. Det är tillräckligt att använda en enstaka koncentration (eller en av koncentrationerna i de positiva kontrollodlingarna om fler än en koncentration används) för att visa att acceptanskriterierna för den positiva kontrollen har uppfyllts. Den positiva kontrollens mutantfrekvens måste dessutom ligga inom det godtagbara intervall som har fastställts av laboratoriet.

Utvärdering och tolkning av resultaten

61. För MLA har ingående arbete om biologisk relevans och kriterier för positiv respons utförts av IWGT:s expertarbetsgrupp för muslymfom (4). Denna testmetod innehåller därför särskilda rekommendationer för tolkning av testkemikalieresultat från MLA (se punkterna 62–64). TK6 har en mycket mindre databas och har inte utvärderats av en arbetsgrupp. Rekommendationerna för tolkning av data för TK6 är därför mer generellt utformade (se punkterna 65–66). Ytterligare rekommendationer gäller för båda testerna (se punkterna 67–71).

MLA

62. En metod för att definiera positiva och negativa responser rekommenderas för att säkerställa att den ökade mutantfrekvensen är biologiskt relevant. I stället för de statistiska analyser som generellt används för andra tester bygger denna metod på användningen av en på förhand fastställd inducerad mutantfrekvens (dvs. en ökning av mutantfrekvensen utöver den parallella kontrollen). Den bestämmer den globala utvärderingsfaktorn (GEF), som i sin tur baseras på en analys av distributionen av data om mutantfrekvensen i negativa kontroller från deltagande laboratorier (4). För agarversionen av MLA är GEF 90×10^{-6}, och för mikrotiterversionen är GEF 126×10^{-6}.

63. Förutsatt att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses en testkemikalie vara klart positiv om ökningen av mutantfrekvensen över den parallella bakgrunden överskrider GEF under något av de undersökta testbetingelserna (se punkt 33), och ökningen är koncentrationsrelaterad (t.ex. med användning av ett trendtest). Testkemikalien anses då kunna inducera mutation i detta testsystem.

64. Förutsatt att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses en testkemikalie vara klart negativ om det inte förekommer någon koncentrationsrelaterad respons under något av de undersökta testbetingelserna (se punkt 33), eller om det finns en ökning av mutantfrekvensen som inte överskrider GEF. Testkemikalien anses då inte kunna inducera mutationer i detta testsystem.

TK6

65. Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart positiv om något av följande gäller för någon av de undersökta testbetingelserna (se punkt 33):

— Minst en av testkoncentrationerna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.

— Det finns ingen koncentrationsrelaterad ökning vid utvärdering med ett lämpligt trendtest (se punkt 33).

— Något av resultaten ligger utanför fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser, se punkt 48).

Om alla dessa kriterier är uppfyllda anses testkemikalien kunna inducera mutation i detta testsystem. Rekommendationer om de lämpligaste statistiska metoderna finns i litteraturen (66) (67).

66. Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart negativ om följande gäller för samtliga undersökta testbetingelser (se punkt 33):

— Ingen av testkoncentrationerna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.

— Det finns ingen koncentrationsrelaterad ökning vid utvärdering med ett lämpligt trendtest.

— Alla resultat ligger inom fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser, se punkt 48).

Testkemikalien anses då inte kunna inducera mutationer i detta testsystem.

För både MLA och TK6:

67. Om den maximala koncentrationen baseras på cytotoxicitet bör den högsta koncentrationen syfta till att uppnå mellan 20 och 10 % RTG/RS. Det råder samförstånd om att man bör vara försiktig vid tolkning av positiva resultat som endast påvisats mellan 20 och 10 % RTG/RS. Resultatet anses inte vara positivt om ökningen av mutantfrekvensen endast inträffade vid eller under 10 % RTG/RS (om dessa värden utvärderas) (2)(59).

68. Under vissa omständigheter kan kompletterande information bidra till att fastställa att en testkemikalie inte är mutagen när det inte finns någon odling som visar ett RTG-värde mellan 10–20 % RTG/RS. Dessa situationer kan beskrivas enligt följande: 1) Det finns inga bevis på mutagenicitet (t.ex. ingen dosrespons, inga mutantfrekvenser över de frekvenser som observerats i den parallella negativa kontrollen eller i historiska bakgrundsintervall osv.) i en serie av datapunkter inom 100 % till 20 % RTG/RS och det finns minst en datapunkt mellan 20 och 25 % RTG/RS. 2) Det finns inga bevis på mutagenicitet (t.ex. ingen dosrespons, inga mutantfrekvenser över de frekvenser som observerats i den parallella negativa kontrollen eller i historiska bakgrundsintervall osv.) i en serie av datapunkter mellan 100 % till 25 % RTG/RS och det finns även en negativ datapunkt strax under 10 % RTG/RS. I båda dessa situationer kan testkemikalien anses vara negativ.

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

70. Om responsen varken är klart negativ eller klart positiv enligt beskrivningen ovan och/eller för att bidra till att fastställa resultatets biologiska relevans bör data utvärderas genom en expertbedömning och/eller ytterligare undersökningar. Det kan även vara användbart att upprepa försöket med ändrade testbetingelser [t.ex. koncentrationsavstånd för att öka sannolikheten för att erhålla datapunkter inom intervallet 10–20 % RTG/RS, användning av andra metaboliska aktiveringsförhållanden (dvs. S9-koncentration eller S9-ursprung) och behandlingstider].

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

TESTRAPPORT

72. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

— källa, satsnummer, sista förbrukningsdag om detta anges,

— testkemikaliens stabilitet i sig, om den är känd,

— löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet, om detta är känt,

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

Monokomponentämne:

— fysikaliskt tillstånd, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— kemisk identifiering, t.ex. med IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet samt motsvarande identifiering av föroreningar i förekommande fall och om det är praktiskt möjligt.

Multikomponentämne, UVCB-ämnen och blandningar:

— karakteriseras så långt som möjligt genom beståndsdelarnas kemiska identitet (se ovan), kvantitativa förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

Lösningsmedel:

— motivering av valet av lösningsmedel,

— procentandelen lösningsmedel i den slutliga odlingsmediet.

Celler:

För stamodlingar i laboratorium:

— cellernas typ och källa samt historia i det testande laboratoriet,

— Kromosomernas karyotypiska egenskaper och/eller modala antal.

— Metoder för underhåll av cellodlingar.

— frånvaro av mykoplasma,

— fördubblingstid.

Testbetingelser:

— grund för val av koncentrationer och antalet cellodlingar, inklusive t.ex. cytotoxicitetsdata och löslighetsbegränsningar,

— Mediets sammansättning, CO_2-koncentration och luftfuktighet.

— Testkemikaliens koncentration, uttryckt som slutlig koncentration i odlingsmediet (t.ex. µg eller mg/ml eller mM av odlingsmediet).

— Koncentration (och/eller volym) av det lösningsmedel och den testkemikalie som tillsätts odlingsmediet.

— inkubationstemperatur,

— inkubationstid,

— behandlingens varaktighet,

— celldensitet under behandlingen,

— typ och sammansättning hos det system som används för metabolisk aktivering (S9-källa, beredningsmetod för S9-blandningen, koncentration eller volym för S9-blandningen, S9 i det slutliga odlingsmediet, kvalitetskontroller av S9),

— positiva och negativa kontrollämnen, slutkoncentrationer för varje behandlingsförhållande,

— Expressionsperiodens längd (inklusive antal celler som inokulerats samt subkulturer och scheman för näringstillförsel, om detta är tillämpligt).

— Det selektiva ämnets identitet och koncentration.

— för MLA bör använd version (agar eller mikrotiterplatta) anges,

— acceptanskriterier för testerna,

— Metoder som används för att räkna antalet viabla och muterade celler.

— Metoder för mätning av cytotoxicitet.

— All tilläggsinformation som är relevant rörande cytotoxicitet samt använd metod.

— Inkubationstidens varaktighet efter överföring till plattor.

— definition av kolonier vars storlek och typ ska beaktas (inklusive kriterier för ”små” och ”stora” kolonier, där detta är tillämpligt),

— kriterier för att bedöma om testresultaten är positiva, negativa eller tvetydiga,

— metoder som används för att bestämma pH, osmolalitet, om detta görs och utfällningar, om relevant.

Resultat:

— antal behandlade celler och antal subkultiverade celler i varje odling,

— toxicitetsparametrar (RTG för MLA och RS för TK6),

— tecken på utfällning och tid för bestämningen,

— Antal celler som överförts till plattor i selektiva och icke-selektiva medier.

— antal kolonier i icke-selektiva medier och antal resistenta kolonier i selektiva medier, samt relaterad mutantfrekvens,

— kolonistorlek för de negativa och positiva kontrollerna, och om testkemikalien är positiv, minst en koncentration och relaterade mutantfrekvenser,

— koncentration-responsförhållande, där det är möjligt,

— data om parallella negativa (lösningsmedel) och positiva kontroller (koncentrationer och lösningsmedel),

— historiska negativa (lösningsmedel) och positiva kontrolldata (koncentrationer och lösningsmedel), med variationer, medelvärden och standardavvikelser, antal tester som de historiska testerna baseras på,

— statistik (för individuella odlingar och sammanslagna replikat, i förkommande fall) samt p-värden om dessa finns, och för MLA, GEF-utvärderingen.

Diskussion av resultaten

Slutsats

LITTERATUR

(1) Moore, M.M., Honma, M. Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): s. 185-190.

(2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (april 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): s. 292-299.

(3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: s. 127-140.

(4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): s. 1-5.

(5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): s. 36-40.

(6) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, nr 234, OECD, Paris.

(7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. och O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): s. 21-28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. och Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493, 1–2: s. 101-114.

(9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. och Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci.., 109 (1): s. 96-105.

(10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. och Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. USA, 87 (1): s. 51-55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. och Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): s. 169-181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. och Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): s. 237-242.

(13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. och Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): s. 161-174.

(14) Liber H.L., Call K.M. och Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): s. 143-153.

(15) Li C.Y., Yandell D.W. och Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): s. 77-87.

(16) Honma M., Hayashi M. och Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): s. 89-98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. och Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): s. 203–214.

(18) Amundson S.A. och Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): s. 89-95.

(19) Schisler M.R., Moore M.M. och Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ −3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: s. 27-50.

(20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. och Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634 (1–2): s. 177-183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I.och Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): s. 439-452.

(22) Brusick D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): s. 879-886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. och Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): s. 297-305.

(24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. och Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257: s. 147-204.

(25) Wang J., Heflich R.H. och Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1–2): s. 185-190.

(26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: s. 673-680.

(27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. och Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): s. 61-108.

(28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. och Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): s. 243-253.

(29) Sawyer J.R., Moore M.M. och Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): s. 181-193.

(30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. och Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$−3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): s. 127-131.

(31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. och Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+}/^{-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): s. 35-42.

(32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. och DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): s. 157-165.

(33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. och Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): s. 263-268.

(34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. och Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): s. 411-416.

(35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45 (2–3): s. 162-176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. och Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): s. 12-15.

(37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manus under bearbetning.)

(38) Lloyd M. och Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35–54.

(39) Mei N., Guo X. och Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. I: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z. och Caldwell (Eds) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): s. 467-485.

(41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. och Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): s. 261-287.

(42) Moore M.M. och Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4–5): s. 287-294.

(43) Ames B.N., McCann J. och Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31 (6): s. 347-364.

(44) Maron D.M. och Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3–4): s. 173-215.

(45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. och De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37 (1): s. 83-90.

(46) Matsuoka A., Hayashi M. och Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66 (3): s. 277-290.

(47) Ong T.M., et al. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. *Pathol. Toxicol.*, 4 (1): s. 55–65

(48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. och Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen., 7 (3): s. 175-177.

(49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. och Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. I: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, s. 85–88.

(50) Galloway S.M., et al.(1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): s. 241-261.

(51) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. och Galloway, S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28 (1): s. 51-59.

(52) Unep (2001). Stockholmskonventionen om långlivade organiska föroreningar, FN:s miljöprogram (Unep).

(53) Krahn, D.F., Barsky, F.C. och McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. I: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L. och Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, s. 91–103.

(54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. och Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): s. 795-801.

(55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. och Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): s. 122-130.

(56) Arlett C.F., et al. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. I: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), CambridgeUniversity Press, s. 66–101.

(57) Morita T., Honma M. och Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): s. 32-56.

(58) Brookmire L., Chen J.J. och Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): s. 36-43.

(59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Se [https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

(60) Honma M. och Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): s. 373-384.

(61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. och Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): s. 363-378.

(62) Liber H.L., Yandell D.W. och Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): s. 9-17.

(63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. och Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): s. 1-8.

(64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. och Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): s. 87-90.

(65) Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.

(66) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental Health and Safety Publications,Series on Testing and Assessment (nr 199), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(67) Fleiss J.L., Levin B. och Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Tillägg 1

DEFINITIONER

Aneugen: en kemikalie eller en process som genom växelverkan med komponenterna i den mitotiska och meiotiska celldelningscykeln leder till aneuploidi i celler eller organismer.

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

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

Kemikalie: Ett ämne eller en blandning.

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

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

Cytotoxicitet: för de analyser som omfattas av denna testmetod definieras cytotoxicitet som en reduktion i den relativa totala tillväxten (RTG) eller den relativa överlevnaden (RS) för MLA respektive TK6.

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

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

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

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

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

Mutantfrekvens: antalet muterade celler som observerats, delat med antalet viabla celler.

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

Relativ överlevnad (RS): RS används som ett mått på behandlingsrelaterad cytotoxicitet i TK6. RS är den relativa kloningseffektiviteten (CE) för celler som överförts till platta omedelbart efter cellbehandling justerat utifrån eventuell cellförlust under behandlingen och jämfört med kloningseffektiviteten i den negativa kontrollen.

Relativ suspensionstillväxt (RSG): för MLA, den relativa totala tvådagars suspensionstillväxten av testodlingen jämförd med den totala tvådagars suspensionstillväxten för den negativa kontrollen/lösningsmedelskontrollen (Clive och Spector, 1975). RSG bör innefatta testodlingens relativa tillväxt jämförd med den negativa kontrollen/lösningsmedelskontrollen under behandlingsperioden.

Relativ total tillväxt (RTG): RTG används som ett mått på behandlingsrelaterad cytotoxicitet i MLA. RTG är ett mått på testodlingarnas relativa tillväxt (jämfört med vehikelkontrollen) under behandlingen, expressionsperioden på två dagar och mutanturvalets kloningsfaser i testet. Testodlingens relativa suspensionstillväxt multipliceras med testodlingens relativa kloningseffektivitet vid tidpunkten för mutanturvalet, och uttrycks i förhållande till den negativa kontrollens/lösningsmedelskontrollens kloningseffektivitet (Clive och Spector, 1975).

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

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

Suspensionstillväxt: x-faldig ökning av antalet celler under behandlingens gång och expressionsfaserna i MLA. Suspensionstillväxten beräknas genom att den x-faldiga ökningen på dag 1 multipliceras med den x-faldiga ökningen på dag 2 för den kortvariga behandlingsperioden (tre eller fyra timmar). Om 24-timmarsbehandling används motsvarar suspensionstillväxten den x-faldiga ökningen under 24-timmarsbehandlingen, multiplicerat med de x-faldiga ökningarna under expressionsdagarna 1 och 2.

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

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

Obehandlade kontroller: odlingar som inte behandlas (dvs. varken testkemikalie eller lösningsmedel tillförs), men som behandlas på samma sätt som de odlingar där testkemikalien tillförs.

Tillägg 2

FORMLER

Cytotoxicitet

För båda versionerna (agar och mikrotiterplatta) av MLA

Cytotoxicitet definieras som relativ total tillväxt (RTG), vilket omfattar relativ suspensionstillväxt (RSG) under expressionsperioden på två dagar och relativ kloningseffektivitet (RCE), som erhållits vid tidpunkten för mutanturvalet. RTG, RSG och RCE uttrycks i procent.

Beräkning av RSG: Suspensionstillväxt ett (SG_1) är tillväxttakten mellan dag 0 och dag 1 (cellkoncentration på dag 1/cellkoncentration på dag 0), och suspensionstillväxt två (SG_2) är tillväxttakten mellan dag 1 och dag 2 (cellkoncentration på dag 2/cellkoncentration på dag 1). RSG är den totala suspensionstillväxten (SG_1 x SG_2) för den behandlade odlingen jämfört med den obehandlade kontrollen/lösningsmedelskontrollen. Det innebär följande: RSG = [$SG_{1(test)}$ x $SG_{2(test)}$] / [$SG_{1(kontroll)}$ x $SG_{2(kontroll)}$]. SG_1 bör beräknas från den ursprungliga cellkoncentration som användes i början av cellbehandlingen. Detta förklarar eventuell differentiell cytotoxicitet som förekommer i testodlingarna under cellbehandlingen.

RCE är testodlingens relativa kloningseffektivitet jämfört med kloningseffektiviteten hos den obehandlade kontroll/lösningsmedelskontroll som erhållits vid tidpunkten för mutanturvalet.

Relativ total tillväxt (RTG): RTG = RSG x RCE

TK6

Relativ överlevnad (RS):

Cytotoxicitet bedöms genom den relativa överlevnaden, dvs. kloningseffektiviteten för celler som överförts till platta omedelbart efter behandling justerat utifrån eventuell cellförlust under behandlingen jämfört med kloningseffektiviteten i negativa kontroller (som tilldelas en överlevnadskvot på 100 %). Justeringen för cellförlust under behandlingen kan beräknas som

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

RS för celler som behandlats av en testkemikalie beräknas på följande sätt:

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

Mutantfrekvens för både MLA och TK6

Mutantfrekvensen (MF) är kloningseffektiviteten hos mutantkolonier i ett selektivt medium CE_M) justerat med kloningseffektiviteten i ett icke-selektivt medium vid tidpunkten för mutanturvalet (CE_V). Det vill säga, MF=CE_M/CE_V. Beräkningen av kloningseffektivitet beskrivs nedan för kloningsmetoderna med agar och mikrotiterplatta.

***Agarversionen av MLA**:* I mjukagarversionen av MLA erhålls antalet kolonier på plattan för mutanturvalet (C_M) och antalet kolonier på plattan för icke utvalda kolonier eller kloningseffektivitet (viabilitetsräkning) (C_V) genom att klonerna räknas direkt. När 600 celler överförs för kloningseffektivitet (CE) till plattorna för mutanturvalet (CE_M) och plattorna för icke utvalda kolonier eller kloningseffektivitet (viabilitetsräkning) (CE_V) och 3×10^6 celler används för mutanturval,

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

Mikrotiterversionen av MLA och TK6: I mikrotiterversionen av MLA C_M och C_V bestäms som produkten av det totala antalet hål (TW) och det förmodade antalet kolonier per hål (P) på mikrotiterplattorna.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Från nolltermen i Poissonfördelningen (Furth et al., 1981), P ges genom

$$P = - \ln (EW / TW)$$

där EW är tomma hål och TW totalt antal hål. Därför

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

För mikrotiterversionen av MLA beräknas mutantfrekvenserna för små och stora kolonier på samma sätt, med användning av antalet tomma hål för små och stora kolonier.

För TK6 baseras mutantfrekvenserna för små och stora kolonier på tidigt och sent uppträdande mutanter.

B.68 TESTMETOD FÖR KORTTIDSEXPONERING IN VITRO FÖR IDENTIFIERING AV i) KEMIKALIER SOM ORSAKAR ALLVARLIG ÖGONSKADA OCH ii) KEMIKALIER FÖR VILKA DET INTE KRÄVS KLASSIFICERING FÖR ÖGONIRRITATION ELLER ALLVARLIG ÖGONSKADA

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 491 (2017). Testmetoden korttidsexponering (STE) är en testmetod in vitro som kan användas under särskilda omständigheter och med specifika begränsningar för faroklassificering och märkning av kemikalier (ämnen och blandningar) som orsakar allvarlig ögonskada och kemikalier för vilka det inte krävs klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada, enligt definitionen i FN:s globala harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (1) och förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP) ([1]).

2. I många år har kemikaliers eventuella skadliga verkan på ögonen huvudsakligen utvärderats med hjälp av ett in vivo-test på kaninögon (TM B.5 (8), motsvarande OECD TG 405). Det är allmänt vedertaget att inget enskilt alternativt in vitro-test inom överskådlig framtid kommer att fullständigt kunna ersätta in vivo-testet på kaninögon för att förutsäga alla typer av allvarlig ögonskada/ögonirritation för olika kemiska klasser. Emellertid kan strategiska kombinationer av alternativa testmetoder som används i en (stegvis) teststrategi mycket väl fullständigt ersätta testet på kaninögon (2). Top-down-strategin är utformad för testning av kemikalier som baserat på befintlig information kan förväntas vara mycket irriterande eller orsaka allvarlig ögonskada. Bottom-up-strategin är däremot utformad för testning av kemikalier som baserat på befintlig information inte förväntas orsaka tillräcklig ögonirritation för att kräva en klassificering. STE-testmetoden anses inte vara en fullständig ersättning för in vivo-testet på kaninögon, men är lämplig för användning som en del av en stegvis teststrategi för lagstadgad klassificering och märkning, såsom top-down-strategin/bottom-up-strategin, för att utan ytterligare testning identifiera i) kemikalier som inducerar allvarlig ögonskada (GHS/CLP-kategori 1), och ii) för kemikalier (exklusive mycket flyktiga ämnen och alla fasta kemikalier utom ytaktiva ämnen) som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada enligt (GHS/CLP Ingen klassificering) (1)(2). Kemikalier som inte förutsägs orsaka allvarlig ögonskada (GHS/CLP-kategori 1) och inte heller inducerar allvarlig ögonskada eller ögonirritation (GHS/CLP Ingen klassificering) enligt STE-testmetoden kräver dock ytterligare testning för att fastställa en definitiv klassificering. Dessutom bör berörda tillsynsmyndigheter rådfrågas innan man använder STE-metoden inom ramen för en bottom-up-strategi enligt andra klassificeringssystem än GHS/CLP. Valet av lämpligaste testmetod och användningen av denna testmetod bör övervägas mot bakgrund av OECD:s vägledningsdokument om ett integrerat synsätt på testning och bedömning av allvarlig ögonskada och ögonirritation (14).

3. Syftet med denna testmetod är att beskriva de förfaranden som används för att utvärdera om en testkemikalie kan vara skadlig för ögonen, baserat på dess förmåga att inducera cytotoxicitet i testmetoden för korttidsexponering. Kemikaliers cytotoxiska effekt på hornhinnans epitelceller är ett viktigt verkningssätt som leder till skada på hornhinnans epitel och ögonirritation. Cellviabiliteten i STE-testmetoden bedöms, efter extraktion av cellerna, med hjälp av en kvantitativ mätning av blått formazansalt, som produceras av de levande cellerna genom enzymatisk omvandling av vitalfärgämnet MTT (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid), även benämnt tiazolylblått-tetrazoliumbromid (3). Den cellviabilitet som erhålls jämförs med lösningsmedelskontrollen (relativ viabilitet) och används för att uppskatta testkemikaliens eventuella skadliga effekt på ögonen. En testkemikalie klassificeras som GHS/CLP-kategori 1 när både koncentrationerna på 5 % och 0,05 % leder till en cellviabilitet som är lägre än eller motsvarar (≤) 70 %. Omvänt klassificeras en testkemikalie som GHS/CLP Ingen klassificering när både koncentrationerna på 5 % och 0,05 % leder till en cellviabilitet som är högre än (≤) 70 %.

4. I denna metod avser begreppet ”testkemikalie” endast testade kemikalier. Frågan om huruvida STE-testmetoden är tillämplig på testning av ämnen och/eller blandningar tas inte upp här. Definitioner av begreppen finns i tillägg 2.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

5. Denna testmetod är baserad på ett protokoll som utvecklats av Kao Corporation (4), som var föremål för två olika valideringsstudier: den ena av Validation Committee of the Japanese Society for Alternative to Animal Experiments

([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).

(JSAAE) (5) och den andra av Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) (6). En sakkunnigbedömning utfördes av NICEATM/ICCVAM baserat på rapporterna om valideringsstudierna och bakgrundsgranskningsdokument om testmetoden (7).

6. Vid identifiering av kemikalier (ämnen och blandningar) som inducerar allvarlig ögonskada (GHS/CLP-kategori 1 (1) visade data som erhållits med hjälp av STE-testmetoden om 125 kemikalier (inklusive både ämnen och blandningar) en övergripande noggrannhet på 83 % (104/125), ett falskt positivt värde på 1 % (1/86), och ett falskt negativt värde på 51 % (20/39) jämfört med in vivo-testet på kaninögon (7). Det falska negativa värde som erhållits är inte kritiskt under nuvarande omständigheter, eftersom alla testkemikalier som inducerar en cellviabilitet på ≤ 70 % vid en koncentration på 5 % och > 70 % vid en koncentration på 0,05 % därefter testas med andra tillbörligt validerade in vitro-testmetoder, eller som ett sista alternativ i in vivo-testet på kaninögon, beroende på kraven i tillämpliga bestämmelser, och enligt strategin med stegvis testning och de metoder för sammanvägd bedömning som för närvarande rekommenderas (1) (8). De ämnen som testades var främst monokomponentämnen, men det finns också vissa data om testning av blandningar. Testmetoden är emellertid tekniskt tillämplig på testning av multikomponentämnen och blandningar. Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man dock överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag. STE-testmetoden visade inga andra specifika brister när den användes för att identifiera testkemikalier som tillhörande GHS/CLP-kategori 1. Forskare kan överväga att använda denna testmetod för testkemikalier. I ett sådant fall bör en cellviabilitet på ≤ 70 % vid både koncentrationen 5 % och 0,05 % godtas som en indikation på en respons som inducerar allvarlig ögonskada och kemikalien bör klassificeras som GHS/CLP-kategori 1 utan ytterligare testning.

7. Vid identifiering av kemikalier (ämnen och blandningar) som inte kräver klassificering för ögonirritation och allvarlig ögonskada (dvs. GHS/CLP Ingen klassificering) visade data som erhållits med hjälp av STE-testmetoden för 130 kemikalier (inklusive både ämnen och blandningar) en övergripande noggrannhet på 85 % (110/130), ett falskt negativt värde på 12 % (9/73), och ett falskt positivt värde på 19 % (11/57) jämfört med in vivo-testet på kaninögon (7). Om mycket flyktiga ämnen och fasta ämnen som inte är ytaktiva ämnen undantas från datamängden förbättras den övergripande noggrannheten till 90 % (92/102), andelen falskt negativa värden till 2 % (1/54), och andelen falskt positiva värden till 19 % (9/48) (7). Detta innebär att de eventuella bristerna hos STE-metoden när den används för att identifiera testkemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation och allvarlig ögonskada (GHS/CLP Ingen klassificering) är en hög andel falskt negativt värden för i) mycket flyktiga ämnen med ett ångtryck över 6 kPa, och ii) andra fasta kemikalier (ämnen och blandningar) än ytaktiva ämnen och blandningar som endast består av ytaktiva ämnen. Sådana kemikalier undantas från tillämpningsområdet för STE-testmetoden (7).

8. Förutom de kemikalier som nämns i punkterna 6 och 7 innehåller de datamängder som genererats genom STE-testmetoden även interna data om 40 blandningar, som när de jämfördes med Draizes ögontest in vivo, visade en noggrannhet på 88 % (35/40), en andel falskt positiva värden på 50 % (5/10), och en andel falskt negativa värden på 0 % (0/30) för förutsägning av blandningar som inte kräver klassificering enligt GHS/CLP-klassificeringssystemet (9). STE-testmetoden kan därför användas för att identifiera blandningar som tillhörande GHS/CLP Ingen klassificering i en bottom-up-strategi, med undantag för andra fasta blandningar än fasta blandningar som endast består av ytaktiva medel, som en förlängning av metodens begränsningar avseende fasta ämnen. Blandningar som består av ämnen med ett ångtryck högre än 6 kPa bör dessutom utvärderas noggrant för att undvika eventuella underskattningar, och bör motiveras från fall till fall.

9. STE-testmetoden kan inte användas för att identifiera testkemikalier som tillhörande GHS/CLP-kategori 2 eller kategori 2A (ögonirritation) eller 2B (svag ögonirritation), eftersom många kemikalier i GHS/CLP-kategori 1 underskattas som kategori 2, 2A, eller 2B och kemikalier i GHS/CLP-kategorin Ingen klassificering överskattas som kategori 2, 2A, eller 2B (7). Därför kan det krävas ytterligare testning med en annan passande metod.

10. STE-testmetoden är lämplig för testkemikalier som löses upp eller suspenderas enhetligt i minst fem minuter i fysiologisk saltlösning, 5 % dimetylsulfoxid (DMSO) i saltlösning eller mineralolja. STE-testmetoden är inte lämplig för testkemikalier som är olösliga eller inte kan suspenderas enhetligt i minst fem minuter i fysiologisk saltlösning, 5 % dimetylsulfoxid (DMSO) i saltlösning eller mineralolja. Det är möjligt att använda mineralolja i STE-testmetoden på grund av den korta tidsexponeringen. STE-testmetoden är därför lämplig för att förutsäga vattenlösliga testkemikaliers skadliga verkan på ögonen (t.ex. långkedjiga fettalkoholer eller ketoner), förutsatt att de är lösliga i minst ett av de tre lösningsmedel som föreslås ovan (4).

11. I denna metod avser begreppet ”testkemikalie” endast testade kemikalier ([1]). Frågan om huruvida DPRA är tillämplig på testning av ämnen och/eller blandningar tas inte upp här.

TESTPRINCIP

12. STE-testmetoden är ett cytotoxicitetsbaserad in vitro-test som utförs på ett konfluent monolager av celler från kaniners hornhinna (SIRC-celler) från Statens Seruminstitut, som odlats på en 96-håls mikrotiterplatta av polykarbonat (4). Efter fem minuters exponering för testkemikalien mäts cytotoxiciteten kvantitativt som SIRC-cellernas relativa viabilitet, med användning av MTT-testet (4). Minskad cellviabilitet används för att förutsäga eventuellt negativa effekter som leder till ögonskador.

13. Det har rapporterats att 80 % av en lösning som droppas in i ett kaninöga utsöndras via konjunktivalsäcken inom tre till fyra minuter, medan mer än 80 % av en lösning som droppas in i en människa öga utsöndras inom en till två minuter (10). STE-metoden försöker närma sig dessa exponeringstider och använder cytotoxicitet som en endpoint för att bedöma graden av skada på SIRC-cellerna efter fem minuters exponering för testkemikalien.

DEMONSTRATION AV KOMPETENS

14. Före rutinanvändning av STE-testmetoden enligt beskrivningen i denna testmetod bör laboratoriet visa teknisk kompetens genom att korrekt klassificera de elva ämnen som rekommenderas i tabell 1. Dessa ämnen valdes för att representera hela responsintervallet för allvarlig ögonskada eller ögonirritation baserat på resultat från in vivo-tester på kaninöga (TG 405) och GHS/CLP-klassificeringssystem (1). Till övriga kriterier hör att ämnena ska vara kommersiellt tillgängliga, att det finns tillgång till in vivo-referensdata av hög kvalitet och att det finns in vivo-data av hög kvalitet från STE-testmetoden (3). När ett listat ämne inte finns tillgängligt eller när det är motiverat kan ett annat ämne som det finns adekvata in vivo- och in vitro-referensdata för användas, förutsatt att samma kriterier tillämpas som de som beskrivs här.

Tabell 1

Förteckning över kvalifikationsämnen

Ämne	CAS-nr	Kemisk klass ([1])	Fysikaliskt tillstånd	In vivo GHS/CLP-kategori ([2])	Lösningsmedel i STE-testet	STE GHS/CLP kategori
Bensalkoniumklorid (10 %, vattenbaserad)	8001-54-5	Oniumförening	Vätska	Kategori 1	Saltlösning	Kategori 1

([1]) I juni 2013 enades det gemensamma mötet om att begreppet testkemikalier när så är möjligt bör användas mer konsekvent för att beskriva vad som testas, vilket nu bör tillämpas på nya och uppdaterade testmetoder.

Ämne	CAS-nr	Kemisk klass (1)	Fysikaliskt tillstånd	In vivo GHS/CLP-kategori (2)	Lösningsmedel i STE-testet	STE GHS/CLP kategori
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Eter	Vätska	Kategori 1	Saltlösning	Kategori 1
Acid Red 92	18472-87-2	Heterocyklisk förening, bromförening, klorförening	I fast form	Kategori 1	Saltlösning	Kategori 1
Natriumhydroxid	1310-73-2	Alkali, oorganisk kemikalie	I fast form	Kategori 1 (3)	Saltlösning	Kategori 1
Butyrolakton	96-48-0	Lakton Heterocyklisk förening	Vätska	Kategori 2A (kategori 2 i CLP)	Saltlösning	Ingen prediktion kan göras
1-Oktanol	111-87-5	Alkohol	Vätska	Kategori 2A /B (4) (kategori 2 i CLP)	Mineralolja	Ingen prediktion kan göras
Cyklopentanol	96-41-3	Alkohol, kolväte (cykliskt)	Vätska	Kategori 2A/B (5) (kategori 2 i CLP)	Saltlösning	Ingen prediktion kan göras
2-etoxyetylacetat	111-15-9	Alkohol, Eter	Vätska	Ingen klassificering	Saltlösning	Ingen klassificering
Dodekan	112-40-3	Kolväte, acykliskt	Vätska	Ingen klassificering	Mineralolja	Ingen klassificering
Metylisobutylketon	108-10-1	Keton	Vätska	Ingen klassificering	Mineralolja	Ingen klassificering

Ämne	CAS-nr	Kemisk klass (1)	Fysikaliskt tillstånd	In vivo GHS/CLP-kategori (2)	Lösningsmedel i STE-testet	STE GHS/CLP kategori
1,1-dimetylguanidinsulfat	598-65-2	Amidin, Svavelförening	I fast form	Ingen klassificering	Saltlösning	Ingen klassificering

(1) De kemiska klasserna tilldelades med användning av information som inhämtats från tidigare NICEATM-publikationer och om sådana inte finns tillgängliga, med användning av National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH®) (via ChemIDplus® [National Library of Medicine], se http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/) samt strukturbestämningar som fastställts av NICEATM.
(2) På grundval av in vivo-test på kaninögon (OECD TG 405) och med användning av GHS/CLP (1).
(3) Klassificering som kategori 1 baseras på hudfrätande potential hos 100 % natriumhydroxid (förtecknad som en kvalifikationskemikalie med hudfrätande potential i OECD TG 435) och kriteriet för GHS/CLP-kategori 1 (1).
(4) Klassificering i kategori 2A eller 2B beror på tolkningen av GHS-kriteriet för att skilja mellan dessa två kategorier, dvs. 2 av 6 jämfört med 4 av 6 djur med effekter på dag 7, vilket krävs för en klassificering i kategori 2A. In vivo-datamängden omfattade två studier med tre djur var. I den ena studien visade 2 av 3 djur effekter på dag 7, vilket föranledde en kategori 2-klassificering (11). I den andra studien återhämtade sig alla endpoints hos samtliga 3 djur till en poäng på noll till dag 7, vilket föranledde en kategori 2B-klassificering (12).
(5) Klassificering i kategori 2A eller 2B beror på tolkningen av GHS-kriteriet för att skilja mellan dessa två kategorier, dvs. 1 av 3 jämfört med 2 av 3 djur med effekter på dag 7, vilket krävs för en klassificering i kategori 2A. In vivo-undersökningen omfattade tre djur. Alla endpoints utom korneaopacitet och konjunktival rodnad hos ett djur återhämtades till noll dag 7 eller tidigare. Det djur som inte hade återhämtat sig fullständigt dag 7 hade en korneaopacitet på 1 och en konjunktival rodnad på 1 (dag 7) som var fullständigt återställd dag 14 (11).

Förkortningar: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number

FÖRFARANDE

Beredning av cellmonolager

15. SIRC, cellinjen från kaniners hornhinna, bör användas i STE-testmetoden. Det rekommenderas att SIRC-cellerna erhålls från en väl kvalificerad cellbank, såsom American Type Culture Collection CCL60.

16. SIRC-celler odlas vid 37 °C i en fuktad atmosfär med 5 % CO_2 i en odlingskolv där odlingsmediet består av Eagle's minimum essential medium (MEM) kompletterat med 10 % fetalt bovinserum (FBS), 2 mM L-glutamin, 50–100 enheter/ml penicillin och 50–100 µg/ml streptomycin. Celler som har blivit konfluenta i odlingskolven bör avskiljas med användning av etylendiamintetraättiksyralösning, med eller utan cellskrapa. Cellerna förökas (t.ex. 2 till 3 passager) i en odlingskolv innan de används för rutintestning, och bör inte genomgå fler än 25 passager från upptining.

17. Celler som är färdiga att användas för STE-testet bereds sedan i lämplig täthet och sås i 96-hålsplattor. Rekommenderad täthet för cellsådden är $6{,}0 \times 10^3$ celler per hål om cellerna används fyra dagar efter sådd eller $3{,}0 \times 10^3$ celler per hål när de används fem dagar efter sådd, vid en odlingsvolym på 200 µl. Celler som används för STE-testet och sås i ett odlingsmedium i lämplig täthet kommer att uppnå en konfluens på mer än 80 % vid testningstillfället, dvs. fyra eller fem dagar efter sådd.

Applicering av testkemikalier och kontrollämnen

18. Förstahandsvalet för lösningsmedel för att lösa upp eller suspendera testkemikalierna är fysiologisk saltlösning. Om testkemikalien uppvisar låg löslighet eller inte kan lösas upp eller suspenderas på ett enhetligt sätt i minst fem minuter i saltlösning används 5 % DMSO (CAS-nr 67-68-5) i saltlösning som andrahandsval. För testkemikalier som inte kan lösas upp eller suspenderas på ett enhetligt sätt i minst fem minuter i varken saltlösning eller 5 % DMSO i saltlösning används mineralolja (CAS-nr 8042-47-5) som tredjehandsval.

19. Testkemikalier löses upp eller suspenderas enhetligt i det valda lösningsmedlet i en koncentration med ett massförhållande på 5 % och späds ytterligare genom 10-faldig seriespädning till koncentrationer på 0,5 % och 0,05 %. Varje testkemikalie ska testas både vid koncentrationer på 5 % och 0,05 %. De celler som odlats i 96-hålsplattan exponeras för 200 µl/hål av antingen en koncentration på 5 % eller 0,05 % av lösningen (eller suspensionen) av testkemikalien i fem minuter vid rumstemperatur. Testkemikalierna (monokomponentämnen eller multikomponentämnen eller blandningar) anses vara rena och späds eller suspenderas enligt metoden, oavsett renhetsgrad.

20. Det odlingsmedium som beskrivs i punkt 16 används som mediumkontroll i varje platta av varje repetition. Cellerna ska även exponeras för prover av lösningsmedelskontrollen i varje platta av varje repetition. Det har bekräftats att de lösningsmedel som anges i punkt 18 inte har några negativa effekter på SIRC-cellernas viabilitet.

21. I STE-testmetoden ska 0,01 % natriumlaurylsulfat (SLS) i saltlösning användas som positiv kontroll i varje platta av varje repetition. För att beräkna cellviabiliteten i den positiva kontrollen måste varje platta av varje repetition även innehålla en lösningsmedelskontroll med saltlösning.

22. Ett blankprov är nödvändigt för att bestämma kompensationen för den optiska densiteten, och bör utföras på hål som endast innehåller fosfatbuffrad saltlösning, men inte kalcium eller magnesium (PBS-) eller celler.

23. Varje prov (testkemikalien vid 5 % och 0,05 %, mediumkontroll, lösningsmedelskontroll och positiv kontroll) bör testas i triplikat i varje repetition genom att cellerna exponeras för 200 µl av en lämplig test- eller kontrollkemikalie i fem minuter vid rumstemperatur.

24. Referensämnen kan användas för utvärdering av förmågan att framkalla ögonirritation hos okända kemikalier tillhörande en specifik kemisk klass eller produktklass, eller för utvärdering av den relativa irritationspotentialen hos ett ögonirriterande ämne inom ett specifikt responsområde.

Mätning av cellviabilitet

25. Efter exponering tvättas cellerna två gånger med 200 µl PBS och 200 µl MTT-lösning (0,5 mg MTT/ml av odlingsmediet) tillsätts. Efter en reaktionstid på två timmar i en inkubator (37 °C, 5 % CO_2) dekanteras MTT-lösningen, MTT-formazan extraheras genom tillsats av 200 µl 0,04 N saltsyra-isopropanol i 60 minuter i mörker vid rumstemperatur, och MTT-formazanlösningens absorbans mäts vid 570 nm med en plattläsare. Testkemikaliernas störningar av MTT-testet (genom färgämnen eller direkt MTT-reduktion) inträffar endast om en betydande mängd av testkemikalien stannar kvar i testsystemet efter sköljning efter exponering, vilket är fallet med 3D-rekonstruerad human hornhinna eller rekonstruerad human epidermisvävnad, men är inte relevant för de 2D-cellodlingar som används för STE-testmetoden.

Tolkning av resultaten och prediktionsmodell

26. De värden för den optiska densiteten (OD) som erhållits för varje testprov används sedan för att beräkna cellviabilitet i förhållande till lösningsmedelskontrollen, som sätts till 100 %. Relativ cellviabilitet uttrycks som en procentenhet och erhålls genom att testkemikaliens OD divideras med lösningsmedelskontrollens OD efter att blankprovets OD har subtraherats från båda värdena.

$$Cellviabilitet(\%) = \frac{(OD_{570}\ för\ testkemikalien) - (OD_{570}\ för\ blank)}{(OD_{570}\ för\ lösningsm.kontr.) - (OD_{570}\ för\ blank)} \times 100$$

Relativ cellviabilitet för varje lösningsmedelskontroll uttrycks likaså som en procentenhet och erhålls genom att varje lösningsmedelskontrolls OD divideras med odlingsmediets OD efter att blankprovets OD har subtraherats från båda värdena.

27. Tre oberoende repetitioner, som var och en innehåller tre replikathål (*dvs.*, n = 9), bör utföras. Det aritmetiska medelvärdet för de tre hålen för varje testkemikalie och lösningsmedelskontroll i varje oberoende repetition används för att beräkna det aritmetiska medelvärdet för relativ cellviabilitet. Det slutliga aritmetiska medelvärdet för cellviabiliteten beräknas från de tre oberoende repetitionerna.

28. Cellviabilitetens brytpunktsvärden för att identifiera testkemikalier som framkallar allvarliga ögonskador (GHS/CLP-kategori 1) och testkemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarliga ögonskador (GHS/CLP Ingen klassificering) ges nedan:

Tabell 2

Prediktionsmodell för STE-testmetoden

Cellviabilitet		Klassificering enligt GHS/CLP	Tillämplighet
vid 5 %	vid 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Ingen klassificering	Ämnen och blandningar, med undantag för i) mycket flyktiga ämnen med ett ångtryck över 6 kPa ([1]), och ii) fasta kemikalier (ämnen och blandningar), andra än ytaktiva medel och blandningar som endast består av ytaktiva medel.
≤ 70 %	> 70 %	Ingen prediktion kan göras	Ej tillämpligt
≤ 70 %	≤ 70 %	Kategori 1	Ämnen och blandningar ([2])

([1]) Blandningar som består av ämnen med ett ångtryck högre än 6 kPa bör dessutom utvärderas noggrant för att undvika eventuella underskattningar, och bör motiveras från fall till fall.

([2]) Baserat på resultat som huvudsakligen uppnåtts med monokomponentämnen, men det finns också vissa data om testning av blandningar. Testmetoden är emellertid tekniskt tillämplig på testning av multikomponentämnen och blandningar. Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag.

Acceptanskriterier

29. Testresultaten anses vara godtagbara om samtliga följande kriterier är uppfyllda:

a) Mediumkontrollens optiska densitet (exponerat för odlingsmediet) bör vara 0,3 eller högre efter det att blankprovets optiska densitet har subtraherats.

b) Lösningsmedelskontrollens viabilitet bör vara 80 % eller högre i förhållande till mediumkontrollen. Om flera lösningsmedelskontroller används i varje repetition bör var och en av dessa kontroller uppvisa en cellviabilitet större än 80 % för att testkemikalierna ska kunna testas med dessa lösningsmedel.

c) Den cellviabilitet som erhålls med den positiva kontrollen (0,01 % SLS) bör ligga inom två standardavvikelser från det historiska medelvärdet. De högre och lägre acceptansgränserna för den positiva kontrollen bör uppdateras ofta, dvs. var tredje månad eller varje gång ett godtagbart test utförs i laboratorier där tester utförs sällan (dvs. mindre än en gång i månaden). Om ett laboratorium inte slutför ett tillräckligt antal försök för att kunna fastställa en statistiskt robust fördelning av de positiva kontrollerna är det godtagbart att de högre och lägre acceptansgränser som har fastställts av metodutvecklaren används, dvs. mellan 21,1 % och 62,3 % enligt laboratoriets historiska data, medan en intern fördelning byggs upp under de första rutintesterna.

d) Standardavvikelsen för den slutliga cellviabilitet som härletts från tre oberoende repetitioner bör vara mindre än 15 % både för koncentrationen på 5 % och 0,05 % av testkemikalien.

Om ett eller flera av dessa kriterier inte är uppfyllt bör resultaten förkastas och ytterligare tre oberoende repetitioner utföras.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

30. Data för varje individuellt hål (t.ex. cellviabilitetsvärden) för varje repetition samt totalt medelvärde, SD och klassificering ska rapporteras.

Testrapport

31. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie och kontrollämnen

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

— Multikomponentämne, UVCB-ämne och blandning: karakteriseras så långt som möjligt genom t.ex. beståndsdelarnas kemiska identitet (se ovan), renhet, kvantitativa förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper (se ovan), i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

— Fysikaliskt tillstånd, volatilitet, pH, LogP, molekylvikt, kemisk klass och andra relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper med relevans för studiens genomförande, i den utsträckning de finns tillgängliga.

— Renhet, kemisk identitet för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.

— Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).

— Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

Testmetodens betingelser och förfaranden

— Namn och adress för sponsor, testanläggning och försöksledare.

— Beskrivning av använd testmetod.

— Använd cellinje, dess källa, antal passager och konfluens för de celler som använts för testningen.

— Detaljerade uppgifter om försöksförfarandet.

— Antal repetitioner och replikat.

— Använda koncentrationer av testkemikalierna (om andra koncentrationer än de rekommenderade har använts).

— Motivering för valet av lösningsmedel för varje testkemikalie.

— Varaktighet för exponeringen för testkemikalien (om en annan exponeringstid än den rekommenderade har använts).

— Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet.

— Beskrivning av utvärderings- och beslutskriterierna.

— Hänvisning till historiska medelvärden för positiva kontroller samt standardavvikelse (SD).

— Demonstration av att laboratoriet är kompetent att tillämpa testmetoden (t.ex. genom testning av kvalifikationsämnen) eller för att visa att testmetoden kan reproduceras över tiden.

Resultat

— För varje testkemikalie och kontrollämne och för varje testad koncentration bör följande anges i tabellform: individuella OD-värden per replikathål, aritmetiskt medelvärde för OD-värdena för varje oberoende repetition, cellviabilitet uttryckt i procent för varje oberoende repetition och det slutliga aritmetiska medelvärdet för cellviabilitet och SD över de tre repetitionerna.

— Resultat för mediumkontrollen, lösningsmedelskontrollen och den positiva kontrollen, som visar lämpliga acceptanskriterier för studien.

— Beskrivning av övriga observerade effekter.

— Övergripande härledda klassificeringar med hänvisning till prediktionsmodell och/eller beslutskriterier.

Diskussion av resultaten

Slutsatser

LITTERATUR

(1) Förenta nationerna (FN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS, det globalt harmoniserade systemet för klassificering och märkning av kemikalier). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Se http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Scott, L., et al. (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

(3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(4) Takahashi Y., et al. (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760–770.

(5) Sakaguchi H., et al. (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.

(6) Kojima H., et al. (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, s. 1855-1869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Se [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Kapitel B.5 i denna bilaga, Akut ögonirritation/ögonkorrosion.

(9) Saito K, et al. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

(10) Mikkelson T.J., Chrai S.S. och Robinson J.R. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm.* Sci.1648-1653.

(11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report nr 48. (2)), Bryssel, Belgien

(12) Gautheron P, et al. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. Fundam Appl *Toxicol.* 18, s. 442-449.

(13) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.

(14) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.

Tillägg

DEFINITIONER

Noggrannhet: Ett mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Exakthet är ett mått på testmetodens prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (13).

Referensämne: ett ämne som används som standard för jämförelse med en testkemikalie. Ett referensämne ska ha följande egenskaper: i) En eller flera enhetliga och tillförlitliga källor. ii) Strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas iii) Kända fysikaliska/kemiska egenskaper, stödjande data om kända effekter och v) känd styrka inom det önskade responsområdet.

Bottom-up-strategi: en stegvis metod som tillämpas på testkemikalier som inte tros kräva klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada. Det första steget är att skilja kemikalier som inte behöver klassificeras (negativt utfall) från andra kemikalier (positivt utfall).

Kemikalie: Ett ämne eller en blandning.

Ögonirritation: ändring som uppstår i ögat efter applicering av en testkemikalie på ögats främre yta och som inte är fullt reversibla inom 21 dagar från appliceringen. Utbytbar med ”reversibla effekter på ögat” och GHS/CLP kategori 2.

Falskt negativt värde: den andel av alla positiva ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som negativ. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

Falskt positivt värde: den andel av alla negativa (icke-aktiva) ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som positiva. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

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

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

Blandning: 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.

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

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.

OD: Optisk densitet

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

Relevans: Beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida testet är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl man genom testet korrekt kan mäta och prediktera den biologiska effekt det gäller. Relevans omfattar också överväganden om en testmetods noggrannhet (konkordans) (10).

Tillförlitlighet: Mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tid, när den utförs med användning av samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier och repeterbarheten inom laboratorier (13).

Sensitivitet: den andel av alla positiva/aktiva kemikalier som klassificeras korrekt i testet. Det är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (10).

Allvarliga ögonskador: vävnadsskada i ögat eller kraftig synnedsättning som uppstår efter applicering av en testkemikalie på ögats främre yta och som inte är fullt reversibel inom 21 dagar från appliceringen (2). Utbytbar med ”irreversibla effekter på ögat” och GHS/CLP kategori 1.

Lösningsmedels-/vehikelkontroll: ett obehandlat prov som innehåller testsystemets alla komponenter, inbegripet lösningsmedlet eller vehikeln som behandlas tillsammans med testkemikaliebehandlade och andra kontrollprover i syfte att fastställa bakgrundsrespons för de prover som behandlas med testkemikalien upplöst i samma lösningsmedel eller vehikel. När detta prov testas med en parallell mediumkontroll, visar provet också huruvida lösningsmedlet eller vehikeln påverkar testsystemet.

Specificitet: den andel av alla negativa/inaktiva kemikalier som klassificeras korrekt i testet. Det är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (13).

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

Ytaktivt ämne: en kemikalie, såsom ett rengöringsmedel, som kan minska en vätskas ytspänning så att lödder bildas eller fasta ämnen penetrerar. Även kallat tensid eller vätmedel.

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

Stegvis teststrategi: en strategi för stegvis testning där all befintlig information om en testkemikalie granskas i en angiven ordning, med användning av förfarandet med sammanvägd bedömning (*weight of evidence*) för att avgöra om det finns tillräckligt med information till hands för att besluta om faroklassificering innan man går vidare till nästa steg. Om testkemikaliens förmåga att framkalla irritation kan fastställas på grundval av befintlig information behövs ingen ytterligare testning. Om testkemikaliens förmåga att framkalla irritation inte kan fastställas på grundval av befintlig information genomförs ett stegvis sekventiellt djurförsöksförfarande tills att det går att fastställa en otvetydig klassificering.

Top-down-strategi: stegvis metod som tillämpas på testkemikalier som misstänks orsaka allvarlig ögonskada. Det första steget är att skilja kemikalier som inducerar allvarlig ögonskada (positivt utfall) från andra kemikalier (negativt utfall).

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

GHS/CLP-kategori 1: se ”allvarliga ögonskador”.

GHS/CLP-kategori 2: se ”ögonirritation”.

GHS/CLP Ingen klassificering: Kemikalier som inte är klassificerade enligt GHS/CLP-kategori 1 eller 2 (eller 2A eller 2B).

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

B.69 **TESTMETOD MED REKONSTRUERAT HUMANT HORNHINNELIKT EPITEL (RhCE) FÖR IDENTIFIERING AV KEMIKALIER SOM INTE KRÄVER KLASSIFICERING ELLER MÄRKNING FÖR ÖGONIRRITATION ELLER ALLVARLIG ÖGONSKADA**

INLEDNING

1. Denna testmetod (TM) motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 492 (2017). *Allvarlig ögonskada* avser vävnadsskada i ögat eller kraftig synnedsättning som uppstår efter applicering av en testkemikalie på ögats främre yta och som inte är fullt reversibel inom 21 dagar från appliceringen, så som definierat enligt FN:s globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (1) och förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP-förordningen) ([1]). Likaså avses med *ögonirritation*, enligt GHS och CLP-förordningen, ändringar som uppstår i ögat efter applicering av en testkemikalie på ögats främre yta och som är fullt reversibla inom 21 dagar från appliceringen. Testkemikalier som orsakar allvarlig ögonskada klassificeras som GHS- och CLP-kategori 1, medan de som orsakar ögonirritation klassificeras som GHS- och CLP-kategori 2. Testkemikalier som inte har klassificerats för ögonirritation eller allvarlig ögonskada definieras som de som inte uppfyller kraven för att klassificeras som GHS- respektive CLP-kategori 1 eller 2 (2A eller 2B), det vill säga de hänvisas till som GHS och CLP Ingen klassificering.

2. Bedömningen av allvarlig ögonskada/ögonirritation har vanligen inbegripit användningen av försöksdjur (TM B.5 [2]). Valet av den lämpligaste testmetoden och användningen av den här testmetoden bör ses i samband med OECD:s vägledning *Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye Irritation* (39).

3. Denna testmetod beskriver ett in vitro-förfarande med vilket det är möjligt att identifiera kemikalier (ämnen och blandningar) som inte behöver klassificeras och märkas för ögonirritation eller allvarlig ögonskada i enlighet med GHS och CLP-förordningen. I testet använder man sig av rekonstruerat humant hornhinnelikt epitel (Reconstructed human Cornea-like Epithelium, RhCE) som imiterar det humana hornhinneepitelets histologiska, morfologiska, biokemiska och fysiologiska egenskaper. Fyra andra in vitro-testmetoder har validerats, bedömts vara vetenskapligt giltiga och antagits som TM B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) och B.68 (6) för att, med avseende på människors hälsa, undersöka endpointen allvarlig ögonskada/ögonirritation.

4. Två validerade tester där man använder sig av kommersiellt tillgängliga RhCE-modeller har inkluderats i denna testmetod. Valideringsstudier för att bedöma ögonirritation/allvarlig ögonskada har genomförts (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) med EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) och SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). Båda dessa tester använder kommersiellt tillgängliga RhCE-vävnadsmodeller som testsystem, och omnämns i nedanstående text som de Validerade referensmetoderna – VRM1 respektive VRM2. Utifrån dessa valideringsstudier och den oberoende expertgranskningen (9) (12) fann man att EpiOcular™ EIT och SkinEthic™ HCE EIT korrekt kan identifiera kemikalier (både ämnen och blandningar) som inte kräver klassificering eller märkning för ögonirritation eller allvarlig ögonskada enligt GHS, och testerna rekommenderades som vetenskapligt giltiga för det ändamålet (13).

5. Det är för närvarande allmänt vedertaget att inom överskådlig framtid kommer ingen enskild in vitro-testmetod helt att kunna ersätta Draizes in vivo-ögontest (2) (14) för att prediktera alla typer av responser i form av allvarlig ögonskada/ögonirritation för olika kemiska klasser. Men strategiska kombinationer av flera olika testmetoder inom ramen för (differentierade) teststrategier, som nedifrån och upp-/uppifrån och ned-strategin, kan eventuellt komma att helt kunna ersätta Draizes ögontest (15). Nedifrån och upp-strategin (15) är utformad för att användas när en kemikalie, utifrån befintlig information, inte förväntas orsaka tillräcklig ögonirritation för att kräva en klassificering, medan uppifrån och ned-strategin (15) är utformad för att användas när en kemikalie, utifrån befintlig information, förväntas orsaka allvarlig ögonskada. EpiOcular™ EIT och SkinEthic™ HCE EIT rekommenderas för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada enligt GHS/CLP-förordningen (Ingen klassificering) utan vidare tester, inom ramen för en teststrategi som nedifrån och upp eller uppifrån och ned, föreslagen av Scott m.fl., till exempel som ett första steg i en nedifrån och upp-strategi, eller som ett av de sista stegen i en uppifrån och ned-strategi (15). Men EpiOcular™ EIT och SkinEthic™ HCE EIT är inte avsedda att

([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).

differentiera mellan GHS-/CLP-kategori 1 (allvarlig ögonskada) respektive kategori 2 (ögonirritation). Denna differentiering kommer att behöva undersökas i ytterligare ett steg i teststrategin (15). En testkemikalie som med EpiOcular™ EIT eller SkinEthic™ HCE EIT identifieras kräva klassificering för ögonirritation/allvarlig ögonskada kommer därför att kräva ytterligare tester (in vitro och/eller in vivo) för att nå en definitiv slutsats (GHS-/CLP-kategori Ingen klassificering, kategori 2 eller kategori 1), med användning av till exempel TM B.47, B.48, B.61 eller B.68.

6. Syftet med denna testmetod är att beskriva det förfarande som används för att utvärdera om en testkemikalie kan vara skadlig för ögonen, utifrån dess förmåga att inducera cytotoxicitet i en RhCE-vävnadsmodell, mätt med MTT-testet (16) (se punkt 21). Viabiliteten i RhCE-vävnaden efter exponering för en testkemikalie fastställs genom jämförelse med vävnader som behandlats med negativt kontrollämne (% viabilitet) och används sedan för att prediktera om testkemikalien kan vara skadlig för ögonen.

7. Prestandastandarder (17) finns tillgängliga för att underlätta valideringen av nya eller modifierade in vitro-RhCE-baserade tester som liknar EpiOcular™ EIT och SkinEthic™ HCE EIT, i enlighet med principerna i OECD:s vägledning nr 34 (18), och möjliggöra ändring av OECD TG 492 vid lämplig tidpunkt. Ömsesidigt accepterande av data (Mutual Acceptance of Data, MAD) enligt OECD-avtalet garanteras endast för tester som validerats enligt prestandastandarder, om OECD har granskat och infogat dessa tester i motsvarande testriktlinje.

DEFINITIONER

8. Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

9. Denna testmetod bygger på kommersiella tredimensionella RhCE-vävnadsmodeller som framställs från antingen primära humana epidermala keratinocyter (dvs. EpiOcular™ OCL-200) eller humana immortaliserade hornhinne-epitelceller (dvs. SkinEthic™ HCE/S). Dessa RhCE-vävnadsmodeller, EpiOcular™ OCL-200 och SkinEthic™ HCE/S, liknar hornhinnans tredimensionella epitelstruktur in vivo och produceras med hjälp av celler från de arter som är av intresse (19) (20). Vidare mäter testerna direkt cytotoxicitet orsakad av kemikaliens penetration av hornhinnan och framkallandet av cell- och vävnadsskada, den cytotoxiska responsen fastställer då det sammantagna utfallet av den allvarliga ögonskadan/ögonirritationen in vivo. Cellskada kan uppstå genom flera olika verkningsmekanismer (se punkt 20), men cytotoxiciteten spelar en viktig, om inte den främsta, mekanistiska rollen för den sammantagna responsen på en kemikalie vid en allvarlig ögonskada/ögonirritation in vivo främst uttryckt genom hornhinnegrumling, irit, konjunktivarodnad och/eller kemos, oberoende av de fysikalisk-kemiska processer som ger upphov till vävnadsskadan.

10. En stor mängd kemikalier, omfattande en stor variation i kemisk typ och klass, molekylvikt, LogP-värden, kemisk struktur och så vidare har testats i den valideringsstudie som ligger till grund för denna testmetod. Valideringsdatabasen för EpiOcular™ EIT innehöll totalt 113 kemikalier, omfattande 95 olika organiska funktionella grupper enligt en QSAR-toolbox-analys från OECD (8). Majoriteten av dessa kemikalier utgjordes av monokomponentämnen, men flera multikomponentämnen (inklusive 3 homopolymerer, 5 sampolymerer och 10 kvasipolymerer) inkluderades också i studien. I fråga om fysikaliskt tillstånd och GHS-/CLP-kategorier fördelade sig de 113 testade kemikalierna som följer: 13 vätskor enligt kategori 1, 15 fasta ämnen enligt kategori 1, 6 vätskor enligt kategori 2A, 10 fasta ämnen enligt kategori 2A, 7 vätskor enligt kategori 2B, 7 fasta ämnen enligt kategori 2B, 27 vätskor enligt Ingen klassificering och 28 fasta ämnen enligt Ingen klassificering (8). Valideringsdatabasen för SkinEthic™ HCE EIT innehöll totalt 200 kemikalier, omfattande 165 olika organiska funktionella grupper (8) (10) (11). Majoriteten av dessa kemikalier utgjordes av monokomponentämnen, men flera multikomponentämnen (inklusive 10 polymerer) inkluderades också i studien. I fråga om fysikaliskt tillstånd och GHS-/CLP-kategorier fördelade sig de 200 testade kemikalierna som följer: 27 vätskor enligt kategori 1, 24 fasta ämnen enligt kategori 1, 19 vätskor enligt kategori 2A, 10 fasta ämnen enligt kategori 2A, 9 vätskor enligt kategori 2B, 8 fasta ämnen enligt kategori 2B, 50 vätskor enligt Ingen klassificering och 53 fasta ämnen enligt Ingen klassificering (10) (11).

11. Denna testmetod kan användas för ämnen och blandningar, för fasta ämnen, vätskor, halvfasta ämnen och vaxer. Vätskorna kan vara vattenbaserade eller inte, fasta ämnen kan vara lösliga eller olösliga i vatten. När det är möjligt bör ämnen i fast form pulveriseras före applicering, ingen annan förbehandling av provet krävs. Gaser och aerosoler har inte bedömts i någon valideringsstudie. Det är tänkbart att de kan testas med RhCE-teknik, men den aktuella testmetoden medger inte tester av gaser och aerosoler.

12. Testkemikalier som absorberar ljus i samma intervall som MTT-formazan (naturligt eller efter behandling) och testkemikalier som direkt kan reducera färgämnet MTT (till MTT-formazan) kan störa mätningarna av vävnadsviabilitet och kräver anpassade kontroller för korrigering. Den sorts anpassade kontroller som kan komma att krävas varierar med den typ av interferens som testkemikalien orsakar och det förfarande som används för att kvantifiera MTT-formazan (se punkterna 36–42).

13. Resultat från pre-valideringsstudier (21) (22) och fullständiga valideringsstudier (8) (10) (11) har visat att både EpiOcular™ EIT och SkinEthic™ HCE EIT kan överföras till laboratorier som kan anses vara nya i fråga om analysernas utförande, och att testerna också är reproducerbara inom och mellan laboratorier. Utifrån dessa studier kan den nivå av reproducerbarhet, uttryckt som prediktionskonkordans, som kan förväntas från EpiOcular™ EIT utifrån data om 113 kemikalier vara i storleksordningen 95 % inom laboratorier och 93 % mellan laboratorier. Nivån på reproducerbarhet, uttryckt som prediktionskonkordans, som kan förväntas från SkinEthic™ HCE EIT utifrån data om 120 kemikalier är i storleksordningen 92 % inom laboratorier och 95 % mellan laboratorier.

14. EpiOcular™ EIT kan användas för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada enligt GHS- och CLP-klassificeringssystemet. Med tanke på de data som erhölls i valideringsstudien (8), har EpiOcular™ EIT en sammantagen noggrannhet på 80 % (baserat på 112 kemikalier), en känslighet på 96 % (baserat på 57 kemikalier), ett falskt negativt värde på 4 % (baserat på 57 kemikalier), en specificitet på 63 % (baserat på 55 kemikalier) och ett falskt positivt värde på 37 % (baserat på 55 kemikalier) i jämförelse med referensdata från in vivo-kaninögontester (TM B.5) (2) (14) klassificerat enligt GHS- och CLP-klassificeringssystemet. En studie där 97 flytande agrokemiska sammansättningar testades med EpiOcular™ EIT uppvisade resultat för denna typ av blandningar som liknade dem som erhölls i valideringsstudien (23). De 97 sammansättningarna fördelade sig som följer: 21 enligt kategori 1, 19 enligt kategori 2A, 14 enligt kategori 2B och 43 enligt Ingen klassificering, klassificerade enligt GHS-klassificeringssystemet baserat på referensdata från in vivo-kaninögontester (TM B.5) (2) (14). En sammantagen noggrannhet på 82 % (baserat på 97 sammansättningar), känslighet på 91 % (baserat på 54 sammansättningar), falskt negativt värde på 9 % (baserat på 54 sammansättningar), specificitet på 72 % (baserat på 43 sammansättningar) och falskt positivt värde på 28 % (baserat på 43 sammansättningar) erhölls (23).

15. SkinEthic™ HCE EIT kan användas för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada enligt GHS och CLP-förordningens klassificeringssystem. Med tanke på de data som erhölls i valideringsstudien (10) (11), har SkinEthic™ HCE en sammantagen noggrannhet på 84 % (baserat på 200 kemikalier), en känslighet på 95 % (baserat på 97 kemikalier), ett falskt negativt värde på 5 % (baserat på 97 kemikalier), en specificitet på 72 % (baserat på 103 kemikalier) och ett falskt positivt värde på 28 % (baserat på 103 kemikalier) i jämförelse med referensdata från in vivo-kaninögontester (TM B.5) (2) (14) klassificerat enligt GHS och CLP-förordningens klassificeringssystem.

16. De falskt negativa värden som erhölls med båda RhCE-testerna, med antingen ämnen eller blandningar, faller inom de 12 % sammantagen sannolikhet att kemikalier klassificeras antingen som GHS- och CLP-kategori 2 eller GHS- och CLP-kategori Ingen klassificering enligt Draizes in vivo-ögontest, i upprepade tester, detta beror på metodens

inneboende inom-test-variation (24). De falskt positiva värdena som erhölls med båda RhCE-testerna med antingen ämnen eller blandningar är inte kritiskt avgörande för denna testmetod eftersom alla testkemikalier som framkallar en vävnadsviabilitet som är lika med eller lägre än de etablerade brytvärdena (se punkt 44) kommer att kräva ytterligare tester med andra in vitro-testmetoder, eller som ett sista alternativ på kaniner, beroende på lagkraven, med hjälp av en strategi med stegvis testning i ett tillvägagångssätt med sammanvägd bedömning. Dessa testmetoder kan användas för alla sorters kemikalier, där ett negativt resultat bör accepteras som underlag för att avstå från att klassificera kemikalien för ögonirritation och allvarlig ögonskada (GHS och CLP Ingen klassificering). Vederbörande tillsynsmyndigheter bör rådfrågas innan EpiOcular™ EIT och SkinEthic™ HCE EIT används för andra klassificeringssystem än för GHS/CLP-förordningen.

17. En begränsning hos denna testmetod är att den inte gör det möjligt att skilja mellan ögonirritation/reversibla effekter på ögat (kategori 2) och allvarliga ögonskador/irreversibla effekter på ögonen (kategori 1) som de definieras i GHS och CLP-förordningen, och inte heller mellan irriterande för ögonen (valfri kategori 2A) och milt irriterande för ögonen (valfri kategori 2B) som definieras i GHS (1). För dessa syften krävs ytterligare tester med andra in vitro-testmetoder.

18. Termen ”testkemikalie” används i denna testmetod för att benämna det som testas ([2]) och är inte kopplad till applicerbarheten hos RhCE-testmetoden för att testa ämnen och/eller blandningar.

TESTETS PRINCIP

19. Testkemikalien appliceras lokalt på minst två tredimensionella RhCE-vävnadsmodeller och vävnadsviabilitet mäts en tid efter exponering och inkubation. Dessa RhCE-vävnader rekonstrueras från primära humana epidermala keratinocyter eller humana immortaliserade hornhinne-epitelceller, vilka har odlats i flera dagar så att de har bildat ett stratifierat, högdifferentierat skivepitel med en morfologi som liknar den hos human hornhinna. EpiOcular™ RhCE-vävnadsmodellen består av minst 3 viabla cellager och en icke-keratiniserad yta, uppvisande en hornhinnelik struktur, jämförbar med den som ses in vivo. SkinEthic™ HCE RhCE-vävnadsmodellen består av minst 4 viabla cellager, inklusive pelarformade basalceller, övergångsformer av wing-celler och ytliga skivepitelceller som liknar dem hos normalt, humant hornhinneepitel (20) (26).

20. Kemiskt inducerad allvarlig ögonskada/ögonirritation, vilken in vivo främst yttrar sig som hornhinnegrumling, irit, konjunktivarodnad och/eller kemos, är resultatet av en kaskad av händelser som börjar med penetration av kemikalien genom hornhinnan och/eller bindhinnan och framkallande av cellskada. Cellskada kan uppstå genom flera olika verkningsmekanismer, inklusive lysering av cellmembran (t.ex. av ytaktiva ämnen, organiska lösningsmedel), koagulation av makromolekyler (särskilt proteiner) (t.ex. av ytaktiva ämnen, organiska lösningsmedel, alkalier och syror), saponifiering av lipider (t.ex. av alkalier), och alkylering eller annan kovalent interaktion med makromolekyler (t.ex. av blekmedel, peroxider och alkylerande ämnen) (15) (27) (28). Men det har visats att cytotoxicitet spelar en viktig, om inte den främsta, mekanistiska rollen för den sammantagna responsen på en kemikalie vid en allvarlig ögonskada/ögonirritation, oberoende av de fysikalisk-kemiska processer som ligger till grund för skadan (29) (30). Vidare bestäms kemikaliens potential till allvarlig ögonskada/ögonirritation i princip av den inledande skadans omfattning (31), vilken korrelerar med omfattningen av celldöd (29) och med omfattningen av efterföljande responser och slutligt utfall (32). Därför påverkar lätt irriterande ämnen i allmänhet endast det ytliga hornhinneepitelet, de milt till måttligt irriterande ämnena skadar i princip epitelet och det ytliga stromat och de kraftigt irriterande ämnena skadar epitelet, det djupa stromat och ibland hornhinnans endotel (30) (33). Mätningen av viabilitet hos RhCE-vävnaden efter lokal exponering för en testkemikalie i syfte att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för allvarlig ögonskada/ögonirritation (GHS- och CLP-kategori Ingen klassificering) grundas på antagandet att alla kemikalier som framkallar allvarlig ögonskada eller ögonirritation kommer att framkalla en cytotoxisk verkan i hornhinnans epitel och/eller bindhinna.

([2]) I juni 2013 enades det gemensamma mötet mellan OECD:s kemikaliekommitté och dess arbetsgrupp om kemikalier, bekämpningsmedel och bioteknik om att när det är möjligt bör nu en mer konsekvent användning av termen ”testkemikalie” i betydelsen ”vad som testas” tillämpas i nya och uppdaterade OECD-testriktlinjer.

21. Viabiliteten hos RhCE-vävnaden mäts traditionellt genom enzymatisk omvandling av färgämnet MTT (3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazoliumbromid, tiazolylblåtetrazoliumbromid, CAS-nr 298-93-1) av vävnadens viabla celler till ett blått MTT-formazansalt som kvantifieras efter extraktion ur vävnader (16). Kemikalier som inte kräver klassificering och märkning enligt GHS/CLP-förordningen (Ingen klassificering) identifieras som de som inte minskar vävnadsviabiliteten under en definierad tröskel (dvs. vävnadsviabilitet > 60 %, i EpiOcular™ EIT och SkinEthic™ HCE EITL ([3]), eller > 50 %, i SkinEthic™ HCE EITS ([4])) (se punkt 44).

DEMONSTRATION AV KOMPETENS

22. Inför rutinmässig användning av RhCE-tester för tillsynsändamål ska laboratorier visa sin tekniska kompetens genom att korrekt prediktera de femton kvalifikationskemikalier som anges i tabell 1. Dessa kemikalier har valts ut från de kemikalier som användes i valideringsstudierna av VRM:erna (8) (10) (11). I urvalet ingår, så långt det är möjligt, kemikalier som i) täcker olika fysikaliska tillstånd, ii) täcker hela intervallet av in vivo-responser av allvarlig ögonskada/ögonirritation utifrån högkvalitativa resultat från in vivo-referenstestet på kaninögon (TM B.5) (2) (14) och GHS-klassificeringssystemet (dvs. kategorier 1, 2A, 2B eller Ingen klassificering) (1) och CLP-klassificeringssystemet (dvs. kategorier 1, 2 eller Ingen klassificering), iii) täcker de olika pådrivande in vivo-faktorerna för klassificering (24) (25), iv) är representativa för de kemikalieklasser som används i valideringsstudien (8) (10) (11), v) täcker ett bra, brett urval av organiska funktionella grupper (8) (10) (11), vi) har väl definierade kemiska strukturer (8) (10) (11), vii) är färgade och/eller reducerar MTT direkt, viii) gav reproducerbara resultat med RhCE-testmetoder i samband med deras validering, ix) predikterades korrekt av RhCE-testmetoder i samband med deras validering, x) täcker hela intervallet av in vivo-responser baserat på högkvalitativa RhCE-testmetoddata (0 till 100 % viabilitet), xi) finns kommersiellt tillgängliga, och xii) inte är förknippade med oöverkomliga anskaffnings- och eller bortskaffningskostnader. I situationer där en kemikalie i förteckningen inte finns att tillgå eller inte kan användas av andra giltiga skäl kan en annan kemikalie som uppfyller de ovan beskrivna kriterierna användas, till exempel en av dem som användes i valideringen av VRM. Men sådana avvikelser bör motiveras.

Tabell 1

Förteckning över kvalifikationskemikalier

Kemiskt namn	CAS-nummer	Organisk funktionell grupp ([1])	Fysikaliskt tillstånd	VRM1 viabilitet (%) ([2])	VRM2 viabilitet (%) ([3])	VRM-prediktion	Reducerar MTT	Färginterf.
Metyltioglykolat ([4])								
2365-48-2	Karboxylsyraester, tioalkohol	Flytande	10,9 - ± 6,4	5,5 ± 7,4	Ingen prediktion kan göras	J (starkt)	N	Hydroxietylakrylat
818-61-1	Akrylat,	alkohol	Flytande	7,5 ± 4,7 ([5])	1,6 ± 1,0	Ingen prediktion kan göras	N	N
2,5-dimetyl-2,5-hexandiol	110-03-2	Alkohol	Fast	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	Ingen prediktion kan göras	N	N
Natriumoxalat	62-76-0	Oxokarboxylsyra	Fast	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	Ingen prediktion kan göras	N	N
In vivo kategori 2A ([4])								
2,4,11,13-Tetraazatetradekan-diimidamid, N,N″-bis(4-klorfenyl)-3,12-diimino-, di-D-glukonat (20 %, vattenbaserad) ([6])	18472-51-0	Aromatisk heterocyklisk halid, arylhalid, dihydroxylgrupp, guanidin	Flytande	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	Ingen prediktion kan göras	N	J (svagt)

([3]) EITL: EIT för flytande ämnen med SkinEthic™ HCE.
([4]) EITS: EIT för fasta ämnen med SkinEthic™ HCE.

Kemiskt namn	CAS-nummer	Organisk funktionell grupp (1)	Fysikaliskt tillstånd	VRM1 viabilitet (%) (2)	VRM2 viabilitet (%) (3)	VRM-prediktion	Reducerar MTT	Färginterf.
Natriumbensoat	532-32-1	Aryl, karboxylsyra	Fast	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	Ingen prediktion kan göras	N	N
***In vivo Kategori* 2B** (4)								
Dietyltoluamid	134-62-3	Bensamid	Flytande	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Ingen prediktion kan göras	N	N
2,2-Dimetyl-3-metylenbicyklo [2.2.1] heptan	79-92-5	Alkan, grenad med tertiärt kol, alken, bicykloheptan, karbocykliska ämnen med ringbrygga, cykloalkan	Fast	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Ingen prediktion kan göras	N	N
***In vivo Ingen* klassificering** (4)								
1-Etyl-3-metylimidazoliumetylsulfat	342573-75-5	Alkoxi, ammoniumsalt, aryl, imidazol, sulfat	Flytande	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Ingen klassificering	N	N
Dikaprylyleter	629-82-3	Alkoxi, eter	Flytande	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Ingen klassificering	N	N
Piperonylbutoxid	51-03-6	Alkoxi, benzodioxol, bensyl, eter	Flytande	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Ingen klassificering	N	N
Polyetylenglykol (PEG-40) hydrerad ricinolja	61788-85-0	Acyl-grupp (acylal), alkohol, allyl, eter	Viskös	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Ingen klassificering	N	N
1-(4-klorfenyl)-3-(3,4-diklorfenyl)urea	101-20-2	Aromatisk heterocyklisk halid, arylhalid, ureaderivat	Fast	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6-,6	Ingen klassificering	N	N
2,2′-Metylen-bis[6-(2H-bensotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetrametylbutyl)-fenol]	103597-45-1	Alkan grenad med kvartärt kol, fuserat karbocykliskt aromatiskt ämne, fuserade mättade heterocykliska ämnen, prekursorer till kinoida ämnen, tert-butyl	Fast	102,7 ± 13-,4	97,7 ± 5,6	Ingen klassificering	N	N

Kemiskt namn	CAS-nummer	Organisk funktionell grupp ([1])	Fysikaliskt tillstånd	VRM1 viabilitet (%) ([2])	VRM2 viabilitet (%) ([3])	VRM-prediktion	Reducerar MTT	Färginterf.
Kaliumtetrafluorborat	14075-53-7	Oorganiskt salt	Fast	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Ingen klassificering	N	N

Förkortningar:

CAS-nummer = nummer i registret som förs av Chemical Abstracts Service, GHS = FN:s globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (1), VRM1 = Validerad referensmetod, EpiOcular™ EIT, VRM2 = Validerad referensmetod, SkinEthic™ HCE EIT, Färginterf. = färginterferens med standardabsorbansmätning av MTT-formazan (optisk densitet, OD).

([1]) Organisk funktionell grupp identifierad med hjälp av en samling definierade regler benämnd Organiska Funktionella Grupper (nästlad) i OECD:s verktygslåda för QSAR, version 3.1 (8).

([2]) Baserat på resultat från EpiOcular™ EIT i valideringsstudien av ögonirritation (EIVS) utförd av EURL ECVAM/Cosmetics Europe (8).

([3]) Baserat på resultat från SkinEthic™ HCE EIT i valideringsstudien (10) (11).

([4]) Baserat på in vivo-kaninögontest (TM B.5/OECD TG 405) (2) (14) och med användning av GHS.

([5]) Baserat på resultat från CEFIC CONsortium for *in vitro* Eye Irritation testing strategy (CON4EI) Study.

([6]) Klassificering i kategori 2A eller 2B beror på tolkningen av GHS-kriteriet för att skilja mellan dessa båda kategorier, dvs. 1 av 3 jämfört med 2 av 3 djur med effekter på dag 7, vilket krävs för en klassificering som kategori 2A. In vivo-studien omfattade 3 djur. Alla endpoints, förutom hornhinnegrumlingen hos ett djur, återhämtades till noll dag 7 eller tidigare. Det djur som inte hade återhämtat sig fullständigt dag 7 hade en hornhinnegrumling på 1 (dag 7) som var fullständigt återställd dag 9.

23. Som en del av kompetenstesterna rekommenderas att användarna efter att ha mottagit vävnaderna verifierar deras barriäregenskaper enligt RhCE-modelltillverkarens specifikationer (se punkter 25, 27 och 30). Detta är särskilt viktigt om vävnader transporteras långa sträckor eller om transporten tar lång tid. När ett test framgångsrikt har etablerats och kompetensen i metodanvändningen har påvisats, behöver sådana verifikationer inte göras rutinmässigt. Vid rutinmässig användning av ett test rekommenderas dock att man med jämna mellanrum bedömer barriäregenskaperna.

FÖRFARANDE

24. De tester som för närvarande omfattas av denna testmetod är de vetenskapligt validerade EpiOcular™ EIT och SkinEthic™ HCE EIT (9) (12) (13), omnämnda som Validerad referensmetod (VRM1 respektive VRM2). Standardförfaranden (Standard Operating Procedures, SOP) för RhCE-testmetoder finns tillgängliga och bör användas när testmetoden genomförs och används i laboratoriet (34) (35). Följande punkter och tillägg 2 beskriver RhCE-testernas huvudsakliga delar och förfaranden.

RHCE-TESTMETODENS DELAR

Allmänna betingelser

25. Relevanta celler av humant ursprung bör användas för att rekonstruera den hornhinneliknande, tredimensionella epitelvävnaden, vilken bör bestå av progressivt stratifierade, men inte förhornade celler. Själva RhCE-vävnadsmodellen bereds inuti ilägg försedda med ett poröst, syntetiskt membran genom vilka näringsämnen kan passera in till cellerna. Flera lager av viabla, icke-keratiniserade epitelceller bör finnas i det rekonstruerade hornhinnelika epitelet. För att det ska vara möjligt att genomföra lokal exponering av testkemikalier på ett sätt som liknar den exponering hornhinneepitelet skulle utsättas för in vivo bör RhCE-vävnadsmodellens epitelyta ha direktkontakt med luften. Vidare bör RhCE-vävnadsmodellen bilda en funktionell barriär som är tillräckligt robust för att motstå snabb penetrering av cytotoxiska referensämnen, till exempel Triton X-100 eller natriumdodecylsulfat (SDS). Barriärfunktionen bör demonstreras och kan skattas genom att fastställa antingen den exponeringstid som krävs för att minska vävnadens viabilitet med 50 % (ET_{50}) efter applicering av ett referensämne vid en specificerad, fast koncentration (t.ex. 100 µl med 0,3-volymprocentig Triton X-100), eller den koncentration vid vilken ett referensämne minskar vävnadens viabilitet med 50 % (IC_{50}) efter en fast exponeringstid (t.ex. 30 minuters behandling med 50 µl SDS) (se punkt 30). Inneslutningsegenskaperna hos RhCE-vävnadsmodellen ska förhindra att testkemikalie passerar runt kanten på den viabla vävnaden, vilket skulle kunna leda till en bristande modellering av hornhinneexponeringen. De celler av humant ursprung som används för att etablera RhCE-vävnadsmodellen ska vara fria från förorening av bakterier, virus, mykoplasma och svamp. Vävnadens sterila tillstånd bör kontrolleras av leverantören så att den är fri från förorening av svamp och bakterier.

Funktionella betingelser

Viabilitet

26. MTT-testet används för kvantifiering av vävnadsviabilitet (16). Viabla celler i RhCE-vävnaden reducerar färgämnet MTT till en blå MTT-formazanfällning, vilken sedan extraheras ur vävnaden med isopropanol (eller ett liknande lösningsmedel). Det

extraherade MTT-formazanet kan kvantifieras, antingen med en standardabsorbansmätning (optisk densitet, OD) eller ett HPLC-/UPLC-spektrofotometriskt förfarande (36). Extraktionsmedlets OD bör vara tillräcklig låg, det vill säga under 0,1. Användare av RhCE-vävnadsmodellen bör se till att varje sats av RhCE-vävnad som används uppfyller de definierade kriterierna för den negativa kontrollen. Intervallet för acceptabla OD-värden för VRM:ernas negativa kontroller ges i tabell 2. En HPLC-/UPLC-spektrofotometrianvändare bör använda OD-intervallen för negativ kontroll angivna i tabell 2 som acceptanskriterier för den negativa kontrollen. Det bör dokumenteras i testrapporten att de vävnader som behandlas med det negativa kontrollämnet är stabila i odling (ger liknande resultat vid viabilitetsmätning) under testets hela exponeringsperiod. Ett liknande förfarande bör följas av vävnadsproducenten som en del av kvalitetskontroll av vävnadssats inför leverans, men i det fallet kan andra acceptanskriterier än de som specificeras i tabell 2 vara tillämpliga. Utvecklaren/leverantören av RhCE-vävnadsmodellen bör fastställa acceptabla gränsvärden (övre och nedre gräns) för den negativa kontrollens OD-värden (under testmetodens kvalitetskontrollbetingelser).

Tabell 2

Acceptansintervall för de negativa kontrollernas optiska densitetsvärden (för testanvändare)

Test	Acceptansintervallets nedre gräns	Acceptansintervallets övre gräns
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (för båda protokollen, för flytande resp. fasta ämnen)	> 0,8 ([1])	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (för båda protokollen, för flytande resp. fasta ämnen)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Denna gräns för godkännande väger in möjligheten av förlängd transport/förvaring (t.ex. > 4 dagar), vilket har visats inte påverka testmetodens prestanda (37).

Barriärfunktion

27. RhCE-vävnaden bör vara tillräckligt tjock och robust för att stå emot snabb penetrering av cytotoxiska referensämnen, bedömt till exempel med ET_{50} (Triton X-100) eller IC_{50} (SDS) (tabell 3). Utvecklaren/återförsäljaren av RhCE-vävnadsmodellen bör demonstrera barriärfunktionen hos varje sats av RhCE-vävnad vid leverans av vävnaden till slutanvändaren (se punkt 30).

Morfologi

28. Histologisk undersökning av RhCE-vävnaden bör fastställa human, hornhinnelik epitelstruktur (omfattande minst 3 lager av viabla epitelceller och en icke-keratiniserad yta). För VRM:erna har lämplig morfologi fastställts av utvecklaren/leverantören och behöver därför inte fastställas på nytt av testmetodanvändaren för varje sats av vävnad som används.

Reproducerbarhet

29. Resultaten för testmetodens positiva och negativa kontroller bör visa reproducerbarhet över tid.

Kvalitetskontroll

30. RhCE-vävnaden bör endast användas om utvecklaren/leverantören har visat att varje sats av RhCE-vävnad motsvarar fastställda leveranskriterier, bland vilka de för viabilitet (punkt 26) och barriärfunktion (se punkt 27) är de mest relevanta. Utvecklaren/leverantören av RhCE-vävnadsmodellen bör fastställa acceptabla gränsvärden (övre och nedre gräns) för barriärfunktioner, uppmätta som ET_{50} eller IC_{50} (se punkterna 25 och 26). I tabell 3 anges de acceptabla gränsvärden för ET_{50} och IC_{50} som utvecklaren/leverantören använder som kvalitetskriterium för leverans av RhCE-vävnaden (använda i VRM:erna). Utvecklaren/leverantören av RhCE-vävnadsmodellen bör tillhandahålla data som demonstrerar överensstämmelse med alla leveranskriterier till testmetodens användare, så att de kan ta med denna information i testrapporten. Endast resultat från vävnader som uppfyller alla dessa leveranskriterier kan godkännas för tillförlitlig prediktion av kemikalier som, i enlighet med GHS/CLP-förordningen, inte kräver klassificering och märkning för ögonirritation eller allvarlig ögonskada.

Tabell 3

Kvalitetskriterium för leverans av en sats

Test	Acceptansintervallets nedre gräns	Acceptansintervallets övre gräns
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl 0,3-volymprocentig Triton X-100)	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (30 minuters behandling med 50 µl SDS)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Applicering av testkemikalien och kontrollämnen

31. Minst två vävnadsreplikat ska användas per testkemikalie och kontrollämne i varje testomgång. Två olika behandlingsprotokoll används, ett för testkemikalier i flytande form och ett för testkemikalier i fast form (34) (35). I båda metodernas respektive protokoll bör vävnadsmodellens yta fuktas med kalcium- och magnesiumfri Dulbeccos fosfatbuffrade saltlösning (Ca^{2+}/Mg^{2+}-fri DPBS) innan testkemikalierna appliceras, för att imitera det mänskliga ögats våta tillstånd. Behandlingen av vävnaderna inleds med exponering för testkemikalie(r) och kontrollämnen. I båda behandlingsprotokollen i båda VRM:erna ska tillräcklig mängd testkemikalie eller kontrollämne appliceras för att jämnt täcka epitelytan samtidigt som man undviker infinit dos (se punkt 32 och 33) (tillägg 2).

32. Testkemikalier som kan pipetteras vid 37 °C eller lägre temperaturer (vid behov med hjälp av en positiv deplacementpipett) behandlas som vätskor i VRM:erna, i annat fall ska de behandlas som fasta ämnen (se punkt 33). I VRM:erna sprids de flytande testkemikalierna jämnt över vävnadsytan (t.ex. minst 60 µl/cm^2 applicering) (se tillägg 2, [33] [34]). Kapillära effekter (ytspänningseffekter) som kan uppstå på grund av de små volymer som appliceras på ilägget (på vävnadsytan) bör undvikas så långt det är möjligt för att garantera korrekt dosering på vävnaden. Vävnader som behandlas med flytande testkemikalier inkuberas i 30 min. under standardodlingsbetingelser (37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relativ luftfuktighet). Vid exponeringstidens slut ska den flytande testkemikalien och kontrollämnena noggrant avlägsnas från vävnadsytan genom grundlig sköljning med Ca^{2+}/Mg^{2+}-fri DPBS vid rumstemperatur. Detta sköljsteg följs efter exponering av en nedsänkning i nytt medium vid rumstemperatur (för att avlägsna eventuella kemikalier som kan ha absorberats in i vävnaden) under en fördefinierad tid, vilken varierar med aktuell VRM. Endast för VMR1 görs en postexponerings-inkubation i nytt medium under standardodlingsbetingelser innan MTT-testet genomförs (se tillägg 2, [34] [35]).

33. Testkemikalier som inte kan pipetteras vid temperaturer upp till 37 °C behandlas i VRM:erna som fasta ämnen. Mängden testkemikalie som appliceras bör vara tillräcklig för att täcka vävnadens hela yta, det vill säga minst 60 mg/cm^2 (tillägg 2). När det är möjligt ska fasta ämnen testas i form av ett fint pulver. Vävnader som behandlas med testkemikalier i fast form inkuberas under en fördefinierad tid (beroende på aktuell VRM) under standardodlingsbetingelser (se tillägg 2 [34] [35]). Vid exponeringstidens slut ska testkemikalien i fast form och kontrollämnena noggrant avlägsnas från vävnadsytan genom grundlig sköljning med Ca^{2+}/Mg^{2+}-fri DPBS vid rumstemperatur. Detta sköljsteg följs efter exponering av en nedsänkning i nytt medium vid rumstemperatur (för att avlägsna eventuella kemikalier som kan ha absorberats in i vävnaden) under en fördefinierad tid, vilken varierar med vald VRM, och en postexponerings-inkubation i nytt medium under standardodlingsbetingelser, innan MTT-testet genomförs (se tillägg 2, [34] [35]).

34. Parallella negativa och positiva kontroller bör inkluderas i varje testomgång för att kontrollera att vävnadens viabilitet (fastställd med negativ kontroll) och känslighet (fastställd med positiv kontroll) håller sig inom de acceptansintervall som har definierats utifrån historiska data. Den parallella negativa kontrollen ger också ett referensvärde (100 % vävnadsviabilitet) för beräkning av relativ viabilitet i den vävnad som behandlats med testkemikalie (% $\text{Viabilitet}_{\text{test}}$). Det ämne som rekommenderas som positivt kontrollämne med VRM:erna är rent metylacetat (CAS-nr 79-20-9, kommersiellt tillgänglig från till exempel Sigma-Aldrich, katalognr 45997, vätska). Rekommenderade ämnen som negativa kontrollämnen i VRM1 och VRM2 är ultrarent H_2O respektive Ca^{2+}/Mg^{2+}-fri DPBS. Dessa är de kontrollämnen som användes vid valideringsstudierna av VRM:erna och för vilka det finns mest historiska data. Användningen av lämpliga alternativa positiva eller negativa kontrollämnen bör vara vetenskapligt och adekvat motiverade. Negativa och positiva kontroller bör testas enligt det/de protokoll som används för de testkemikalier vilka ingår i testomgången (dvs. för flytande och/eller fasta ämnen). Denna applicering bör följas av behandlingsexponeringen, sköljning, en nedsänkning efter exponering, och i aktuella fall en postexponerings-inkubation, som beskrivits för kontrollomgångar som görs parallellt med flytande testkemikalier (se punkt 32) eller för kontrollomgångar som görs parallellt med testkemikalier i fast form (se punkt 33), innan MTT-testet görs (se punkt 35) (34) (35). En uppsättning negativa och positiva kontroller är tillräcklig för alla testkemikalier i samma fysikaliska tillstånd (flytande eller fast form) som ingår i samma testomgång.

Mätningar av vävnadsviabilitet

35. MTT-testet är en standardiserad kvantitativ metod (16) som bör användas för att mäta vävnadsviabiliteten i denna testmetod. Den kan användas på en tredimensionell vävnadsmodell. MTT-testet utförs omedelbart efter postexponerings-inkubationen. I VRM:erna placeras RhCE-vävnadsprovet i 0,3 ml av 1 mg/ml MTT-lösning under 180 ± 15 min. vid standardodlingsbetingelser. Färgämnet MTT reduceras av de viabla cellerna i RhCE-vävnaden till en blå MTT-formazanfällning. Den utfällda blå MTT-formazanprodukten extraheras sedan från vävnaden med lämplig volym isopropanol (eller liknande lösningsmedel) (34) (35). Extraktion av de vävnader som har testats med flytande testkemikalier bör göras från både ovan- och undersidan av vävnaden, medan extraktion av vävnader som testats med fasta kemikalier eller färgade vätskor bör göras endast från vävnadens undersida (för att minimera eventuell kontamination av isopropanol-extraktionslösning med eventuellt kvarvarande testkemikalie på vävnadens yta). För vävnader som testats med flytande testkemikalier som inte enkelt kan tvättas bort kan extraktionen också göras från enbart undersidan. De parallellt testade negativa och positiva kontrollämnena ska behandlas på samma sätt som den testade kemikalien. Det extraherade MTT-formazanet kan kvantifieras antingen genom standardabsorbansmätning (OD) vid 570 nm med hjälp av ett filterbandpass på högst ± 30 nm eller genom att använda ett HPLC-/UPLC-spektrofotometriskt förfarande (se punkt 42) (11) (36).

36. Optiska egenskaper hos testkemikalien eller dess kemiska verkan på MTT kan störa mätningarna av MTT-formazan och ge felaktiga skattningar av vävnadsviabilitet. Testkemikalier kan störa mätningarna av MTT-formazan genom direkt reduktion av MTT till blått MTT-formazan, och/eller genom färginterferens om testkemikalien absorberar, naturligt eller till följd av behandlingsprocedurer, inom samma OD-intervall som MTT-formazan (dvs. runt 570 nm). Förkontroller bör göras inför testerna för att identifiera möjliga direkt MTT-reducerande ämnen och/eller färginterfererande kemikalier, och ytterligare kontroller bör användas för att detektera och korrigera möjliga störningar från sådana testkemikalier (se punkterna 37–41). Detta är särskilt viktigt när en viss testkemikalie inte har avlägsnats helt från RhCE-vävnaden genom sköljning, eller när den penetrerar det hornhinneliknande epitelet och därför förekommer i RhCE-vävnaden när MTT-testet utförs. För testkemikalier som absorberar ljus i samma intervall som MTT-formazan (naturligt eller efter behandling) och som inte är kompatibla med standardabsorbansmätningen (OD) av MTT-formazan på grund av för stor interferens, det vill säga stark absorption vid 570 ± 30 nm, kan ett HPLC-/UPLC-spektrofotometriskt förfarande för att mäta MTT-formazan användas (se punkterna 41 och 42) (11) (36). En detaljerad beskrivning av hur man detekterar och korrigerar direkt MTT-reduktion och interferenser av färgämnen finns i VRM:ernas standardförfaranden (34) (35). Illustrerande flödesscheman som ger vägledning i hur man i VRM1 respektive VRM2 identifierar och hanterar direkt MTT-reducerande ämnen och/eller färginterfererande kemikalier finns också i tillägg 3 och 4.

37. För att identifiera möjlig interferens från testkemikalier som absorberar ljus i samma intervall som MTT-formazan (naturligt eller efter behandling) och besluta om behovet av ytterligare kontroller, blandas testkemikalien med vatten och/eller isopropanol och inkuberas en lämplig tid i rumstemperatur (se tillägg 2, [34] [35]). Om testkemikalien, blandad med vatten och/eller isopropanol, absorberar tillräckligt med ljus inom intervallet 570 ± 20 nm för VRM1 (se tillägg 3), eller om en färgad lösning erhålls när testkemikalien blandas med vatten för VRM2 (se tillägg 4), antas testkemikalien störa standardabsorbansmätningen (OD) för MTT-formazan och ytterligare färgkontroller bör göras, alternativt kan ett HPLC-/UPLC-spektrofotometriskt förfarande användas varvid dessa kontroller inte krävs (se punkter 41 och 42 och tillägg 3 och 4) (34) (35). När standardabsorbansmätningen (OD) utförs bör varje interfererande testkemikalie appliceras på minst två viabla vävnadsreplikat, vilka går igenom hela testförfarandet men under MTT-inkubationssteget inkuberas med medium istället för MTT-lösning för att ge en icke-specifik färgkontroll för levande vävnader (NSC_{living}) (34) (35). Den icke-specifika färgkontrollen NSC_{living} behöver utföras parallellt med testerna av den färgade testkemikalien, och i händelse av flera tester ska en oberoende NSC_{living}-kontroll utföras vid varje genomfört test (i varje testomgång) på grund av den inneboende biologiska variationen i levande vävnader. Faktisk vävnadsviabilitet beräknas som följer: den procentuella vävnadsviabilitet som erhålls med levande vävnad som har exponerats för den interfererande testkemikalien och som har inkuberats med MTT-lösning (% $Viabilitet_{test}$) minus den procentuella icke-specifika färg som erhålls med levande vävnad, vilken har exponerats för den interfererande kemikalien och som har inkuberats med medium utan MTT, parallellt med testet som korrigeras (% NSC_{living}) det vill säga Faktisk vävnadsviabilitet = [% $Viabilitet_{test}$] − [% NSC_{living}].

38. För att identifiera ämnen som direkt reducerar MTT bör varje testkemikalie blandas med nyblandad MTT-lösning. En lämplig mängd testkemikalie tillsätts till en MTT-lösning och blandningen inkuberas i ungefär 3 timmar under standardodlingsbetingelser (se tillägg 3 och 4) (34) (35). Om MTT-blandningen som innehåller testkemikalien (eller suspensionen, för olösliga testkemikalier) blir blå/lila, antas testkemikalien direkt reducera MTT och vidare funktionskontroller av icke-viabla RhCE-vävnader bör utföras, oberoende av standardabsorbansmätningen (OD) eller ett HPLC-/UPLC-spektrofotometriskt förfarande. Denna ytterligare funktionella kontroll använder sig av avdödad vävnad som endast har metabolisk restaktivitet men absorberar och behåller testkemikalien på ett sätt som liknar levande vävnader. Avdödad vävnad bereds i VRM1 genom exponering för låg temperatur (”frysdödad”). Avdödad vävnad bereds i VRM2 genom förlängd inkubation (t.ex. minst 24 ± 1 timmar) i vatten följd av förvaring vid låg temperatur (”vattendödad”). Varje testkemikalie som reducerar MTT appliceras på minst två avdödade vävnadsreplikat, vilka genomgår hela testförfarandet för att ge en icke-specifik MTT-reduktionskontroll (NSMTT) (34) (35). En enda NSMTT-kontroll per testkemikalie räcker, oavsett antalet oberoende tester/testomgångar som genomförs. Faktisk vävnadsviabilitet beräknas som följer: den procentuella vävnadsviabilitet som erhålls med levande vävnad som exponerats för den MTT-reducerande kemikalien (% $Viabilitet_{test}$) minus den procentuella icke-specifika MTT-reduktion som erhålls med den avdödade vävnaden, vilken exponerats för samma MTT-reducerande ämne, beräknad i förhållande till den negativa kontroll som har löpt parallellt med det test som korrigeras (% NSMTT) det vill säga Faktisk vävnadsviabilitet = [% $Viabilitet_{test}$] − [% NSMTT].

39. Testkemikalier som konstateras både ge färginterferens (se punkt 37) och direkt reducera MTT (se punkt 38) kommer dessutom att kräva en tredje uppsättning kontroller när man utför standardabsorbansmätningen (OD), utöver de NSMTT- och NSC_{living}-kontroller som beskrivits i föregående punkter. Detta är oftast fallet med mörkt färgade testkemikalier som absorberar ljus i intervallet 570 ± 30 nm (t.ex. blå, lila, svart) eftersom deras färg försvårar skattningen av deras förmåga att direkt reducera MTT, som beskrivits i punkt 38. Detta tvingar fram användningen av NSMTT-kontroller, som standard, tillsammans med NSC_{living}-kontroller. Testkemikalier för vilka både NSMTT- och NSC_{living}-kontroller utförs kan absorberas och stanna kvar i både levande och avdödad vävnad. Därför kan NSMTT-kontrollen korrigera, inte bara för testkemikaliens eventuella, direkta MTT-reduktion, utan också för färginterferens som uppstår vid absorption och retention av testkemikalien i avdödad vävnad. Detta skulle kunna leda till dubbel korrigering för färginterferens eftersom NSC_{living}-kontrollen redan korrigerar för färginterferens som uppstår vid absorption och retention av testkemikalien i levande vävnad. För att undvika möjlig dubbel korrigering för

färginterferens behöver en tredje kontroll för icke-specifik färg i avdödad vävnad (NSC_{killed}) genomföras (se tillägg 3 och 4) (34) (35). I denna ytterligare kontroll behöver testkemikalien appliceras på minst två avdödade vävnadsreplikat, vilka genomgår hela testförfarandet men som inkuberas med medium istället för MTT-lösning under steget med MTT-inkubation. En enda NSC_{killed}-kontroll per testkemikalie räcker, oavsett antalet oberoende tester/testomgångar som genomförs, men bör genomföras parallellt med NSMTT-kontrollen och med samma sats av vävnader. Faktisk vävnadsviabilitet beräknas som följer: den procentuella vävnadsviabilitet som erhålls med levande vävnad som exponerats för testkemikalien (% $Viabilitet_{test}$) minus % NSMTT minus % NSC_{living} plus den procentuella icke-specifika färg som erhålls med den avdödade vävnaden vilken exponerats för den interfererande testkemikalien och inkuberats med medium utan MTT, beräknad i förhållande till den negativa kontroll som har löpt parallellt med det test som korrigeras (%NSC_{killed}), det vill säga Faktisk vävnadsviabilitet = [% $Viabilitet_{test}$] − [% NSMTT] − [% NSC_{living}] + [% NSC_{killed}].

40. Det är viktigt att notera att icke-specifik MTT-reduktion och icke-specifik färginterferens (i samband med standardabsorbansmätningar) kan öka vävnadsextraktets OD över spektrofotometerns linjära intervall och att icke-specifik MTT-reduktion (i samband med HPLC-/UPLC-spektrofotometriska mätningar) också kan öka vävnadsextraktets topparea för MTT-formazan över spektrofotometerns linjära intervall. På grund av detta är det viktigt att varje laboratorium fastställer det linjära intervallet för OD/topparea hos sin spektrofotometer med till exempel MTT-formazan (CAS-nr 57360-69-7), kommersiellt tillgänglig från till exempel Sigma-Aldrich (katalognr M2003), innan testning av testkemikalier påbörjas i tillsynssyfte.

41. Standardabsorbansmätning (OD) med hjälp av en spektrofotometer är lämplig vid bedömning av direkta MTT-reducerare och färginterferande testkemikalier när den aktuella störningen av MTT-formazanmätningen inte är för kraftig (dvs. OD-värdena för vävnadsextrakten som erhålls med testkemikalien, utan korrektion för direkt MTT-reduktion och/eller färginterferens, ligger inom spektrofotometerns linjaritetsintervall). Men resultat där en testkemikalie ger % NSMTT och/eller % NSC_{living} ≥ 60 % (VRM1, och VRM2-protokoll för flytande ämnen) eller 50 % (VRM2-protokoll för fasta ämnen) av den negativa kontrollen bör hanteras med försiktighet eftersom dessa är de etablerade brytvärden som används i VRM:erna för att skilja klassificerade från icke-klassificerade kemikalier (se punkt 44). Men standardabsorbans (OD) kan inte mätas när interferensen med MTT-formazanmätningen är för kraftig (dvs. det leder till att okorrigerade OD-värden för testvävnadsextrakten faller utanför spektrofotometerns linjära intervall). Färgade testkemikalier, eller testkemikalier som blir färgade vid kontakt med vatten eller isopropanol, som interfererar för starkt med standardabsorbansmätningen (OD) för MTT-formazan kan ändå utvärderas med HPLC-/UPLC-spektrofotometri (se tillägg 3 och 4). Anledningen till det är att HPLC-/UPLC-systemet gör det möjligt att skilja MTT-formazanet från testkemikalien innan den kvantifieras (36). Därför krävs inga NSC_{living}- eller NSC_{killed}-kontroller när man använder HPLC-/UPLC-spektrofotometri, oberoende av vilken kemikalie som testas. Trots detta bör NSMTT-kontroller användas, om testkemikalien misstänks direkt reducera MTT (enligt förfarande beskrivet i punkt 38). Dessutom bör NSMTT-kontroller också användas tillsammans med testkemikalier som har en färg (inneboende eller som uppkommer i vattenlösning) som hämmar bedömningen av deras kapacitet att direkt reducera MTT så som beskrivits i punkt 38. Vid användning av HPLC/UPLC-spektrofotometri för att mäta MTT-formazan beräknas vävnadens viabilitet som förhållandet (i procent) mellan å ena sidan den topparea för MTT-formazan som erhållits med levande vävnad exponerad för testkemikalien och, å andra sidan, den topparea för MTT-formazan som erhållits med den parallellt utförda negativa kontrollen. För testkemikalier som direkt kan reducera MTT beräknas faktisk vävnadsviabilitet som följer: % $viabilitet_{test}$ minus % NSMTT, som beskrivs i den sista meningen under punkt 38. Slutligen bör man notera att direkta MTT-reducerare eller direkta MTT-reducerare som också är färginterfererande, vilka stannar kvar i vävnaderna efter behandling och reducerar MTT så kraftigt att de leder till OD-värden (vid standard OD-mätning) eller toppareor (vid UPLC-/HPLC-spektrofotometri) hos de testade vävnadsextrakten som faller utanför spektrofotometerns linjära intervall inte kan bedömas med RhCE-testmetoder, även om de förväntas förekomma väldigt sällan.

42. HPLC-/UPLC-spektrofotometri kan användas för alla sorters testkemikalier (färgade, icke-färgade, MTT-reducerare och icke-MTT-reducerare) för MTT-formazanmätning (11) (36). På grund av mångfalden av HPLC/UPLC-spektrofotometersystem är det inte möjligt för varje användare att upprätta exakt samma systemförhållanden. Innan det spektrofotometriska HPLC-/UPLC-systemet används för att kvantifiera MTT-formazan från vävnadsextrakt bör dess kvalifikationer påvisas genom att det visas motsvara acceptanskriterierna för en uppsättning standardparametrar för kvalificering, baserade på de parametrar som beskrivs i branschvägledningen från amerikanska Food and Drug Administration för validering av bioanalytiska metoder (36) (38). Dessa nyckelparametrar och deras acceptanskriterier visas i tillägg 5. När de acceptanskriterier som definieras i tillägg 5 har uppfyllts anses det spektrofotometriska HPLC-/UPLC-systemet vara kvalificerat och färdigt att mäta MTT-formazan under de experimentella förhållanden som beskrivs i denna testmetod.

Acceptanskriterier

43. För varje testomgång där man använder satser av RhCE-vävnad som uppfyllt kvalitetskraven (se punkt 30), ska de vävnadsprover som behandlas med negativt kontrollämne uppvisa OD som motsvarar den kvalitet vävnaderna hade efter frakt, mottagningsrutiner och alla protokollrelaterade procedurer och bör inte ligga utanför de historiskt fastställda gränserna som beskrivs i tabell 2 (se punkt 26). På samma sätt ska vävnader som behandlas med positivt kontrollämne, det vill säga metylacetat, uppvisa genomsnittlig vävnadsviabilitet < 50 % i förhållande till den negativa kontrollen i VRM1, med protokollet för antingen flytande eller fasta ämnen, och ≤ 30 % (protokollet för flytande ämnen) eller ≤ 20 % (protokollet för fasta ämnen) i förhållande till den negativa kontrollen i VRM2 så att de återspeglar vävnadernas förmåga att svara på en irriterande testkemikalie under testmetodens förhållanden (34) (35). Variationen mellan vävnadsreplikat med testkemikalier och kontrollämnen bör falla inom accepterade gränser (dvs. skillnaden i viabilitet mellan två vävnadsreplikat bör vara mindre än 20 %, eller standardavvikelsen [SD] mellan tre vävnadsreplikat bör inte överstiga 18 %). Om antingen den negativa eller positiva kontrollen som ingår i en testomgång faller utanför accepterat intervall anses omgången ”icke-kvalificerad” och bör upprepas. Om variationen mellan vävnadsreplikat av en testkemikalie faller utanför det accepterade intervallet anses testet ”icke-kvalificerat” och testkemikalien bör testas på nytt.

Tolkning av resultaten och prediktionsmodell

44. De OD-värden/toppareor som erhålls med extrakten från vävnadsreplikaten för varje testkemikalie ska användas för att beräkna genomsnittlig procentuell vävnadsviabilitet (medelvärde mellan vävnadsreplikaten) normaliserad mot negativ kontroll, vilken sätts som 100 %. Brytvärdet för procentuell vävnadsviabilitet som identifierar testkemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada (GHS och CLP Ingen klassificering) ges i tabell 4. Resultat ska då tolkas som följer:

— Testkemikalien fastställs till att inte kräva klassificering och märkning enligt GHS och CLP-förordningen (Ingen klassificering) om medelvärdet för procentuell vävnadsviabilitet efter exponering och postexponerings-inkubation är mer än (>) det fastställda brytvärdet för procentuell vävnadsviabilitet, enligt tabell 4. I detta fall krävs ingen ytterligare testning med andra testmetoder.

— Om medelvärdet för procentuell vävnadsviabilitet efter exponering och postexponerings-inkubation är lika med eller mindre än (≤) det fastställda brytvärdet för procentuell vävnadsviabilitet, kan ingen prediktion göras, som visas i tabell 4. I det här fallet kommer ytterligare testning med andra testmetoder att krävas eftersom RhCE-testmetoder visar ett visst antal falskt positiva resultat (se punkterna 14–15) och inte kan särskilja mellan GHS- och CLP-kategorierna 1 och 2 i (se punkt 17).

Tabell 4

Prediktionsmodeller för GHS- och CLP-klassificering

VRM	Ingen klassificering	Ingen prediktion kan göras
VRM1 – EpiOcular™ EIT (för båda protokollen)	Genomsnittlig vävnadsviabilitet > 60 %	Genomsnittlig vävnadsviabilitet ≤ 60 %
VRM2 – SkinEthic™ HCE EIT (för protokollet för flytande ämnen)	Genomsnittlig vävnadsviabilitet > 60 %	Genomsnittlig vävnadsviabilitet ≤ 60 %
VRM2 – SkinEthic™ HCE EIT (för protokollet för fasta ämnen)	Genomsnittlig vävnadsviabilitet > 50 %	Genomsnittlig vävnadsviabilitet ≤ 50 %

45. Ett enskilt test med minst två vävnadsreplikat bör vara tillräckligt för en testkemikalie, förutsatt att resultatet är otvetydigt. Om man får resultat som ligger på gränsen, t.ex. icke-konkordanta replikatmätningar och/eller genomsnittlig procentuell vävnadsviabilitet lika med 60 ± 5 % (VRM1, och VRM2 med protokoll för flytande ämnen) eller 50 ± 5 % (VRM2 med protokoll för fasta ämnen), bör man dock överväga ett andra test, och ett tredje om resultaten mellan de två första testerna är diskordanta.

46. Olika brytvärden för procentuell vävnadsviabilitet vilka skiljer klassificerade från icke-klassificerade testkemikalier kan övervägas för särskilda sorters blandningar, när så är lämpligt och motiverat, för att öka testmetodens sammantagna prestanda för den sortens blandningar (se punkt 14). Referenskemikalier kan vara värdefulla vid utvärdering av potentialen för allvarlig ögonskada/ögonirritation hos okända testkemikalier eller okänd produktklass, eller för att utvärdera den relativa okulära toxicitetspotentialen hos en klassificerad kemikalie inom ett specifikt intervall av positiva responser.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

47. Data från enskilda vävnadsreplikat i en testomgång (t.ex. OD-värden/MTT-formazantoppareor och beräknade procentuella vävnadsviabilitetsdata för testkemikalien och kontrollerna, och den slutliga prediktionen från RhCE-testmetoden) bör rapporteras i tabellform för varje testkemikalie, inklusive data från upprepade tester, när det är lämpligt. Dessutom bör genomsnittlig procentuell vävnadsviabilitet och skillnad i viabilitet mellan två vävnadsreplikat (om n = 2 vävnadsreplikat) eller SD (om n > 3 vävnadsreplikat) för varje enskild testkemikalie och kontroll rapporteras. Eventuella uppmärksammade interferenser av en testkemikalie med mätningen av MTT-formazan genom direkt MTT-reduktion och/eller färginterferens bör rapporteras för varje testad kemikalie.

Testrapport

48. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie

Monokomponentämne

— Kemisk beteckning, såsom IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel och/eller andra beteckningar.

— Fysikaliskt tillstånd, volatilitet, pH, LogP, molekylvikt, kemisk klass och andra relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper med relevans för studiens genomförande, i den utsträckning de finns tillgängliga.

— Renhet, kemisk identitet för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.

— Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).

— Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

Multikomponentämne, UVCB och blandning

— karakteriseras så långt som möjligt genom t.ex. beståndsdelarnas kemiska identitet (se ovan), renhet, kvantitativa förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper (se ovan), i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

— Fysikaliskt tillstånd och andra relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper med relevans för studiens genomförande, i den utsträckning de finns tillgängliga.

— Renhet, kemisk identitet för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.

— Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).

— Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

Positiva och negativa kontrollämnen

— Kemisk beteckning, såsom IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel och/eller andra beteckningar.

— Fysikaliskt tillstånd, volatilitet, molekylvikt, kemisk klass och andra relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper med relevans för studiens genomförande, i den utsträckning de finns tillgängliga.

— Renhet, kemisk identitet för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.

— Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).

— Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

— Motivering till varför annan negativ kontroll än ultrarent H_2O eller Ca^{2+}/Mg^{2+}-fri DPBS använts, om tillämpligt.

— Motivering till varför annan positiv kontroll än ren metylacetat använts, om tillämpligt.

— Hänvisning till historiska positiva och negativa kontrollresultat som visar lämpliga acceptanskriterier för testomgångarna.

Uppgifter om sponsor och testanläggning

— Namn och adress för sponsor, testanläggning och försöksledare.

— *Uppgift om vilken RhCE-vävnadsmodell och vilket protokoll som använts (med motivering till valen, om tillämpligt)*

Testmetodens betingelser

— Använd RhCE-vävnadsmodell, inklusive satsnummer.

— Våglängd och filterbandpass (om tillämpligt) som använts för kvantifiering av MTT-formazan, och linjärt intervall hos mätanordningen (t.ex. spektrofotometer).

— Beskrivning av den metod som använts för att kvantifiera MTT-formazan.

— Beskrivning av det spektrofotometriska HPLC-/UPLC-systemet, om tillämpligt.

— Fullständig stödjande information för den specifika RhCE-vävnadsmodell som använts, inklusive dess prestanda. Denna ska omfatta men inte vara begränsad till följande:

i) Kvalitetskontroll av viabilitet (leverantör).

ii) Viabilitet under testmetodens betingelser (användare).

iii) Kvalitetskontroll av barriärfunktion.

iv) Morfologi, om tillgänglig.

v) Reproducerbarhet och prediktiv kapacitet.

vi) Andra kvalitetskontroller (QC) av RhCE-vävnadsmodellen, om tillgängliga.

— Hänvisning till historiska data om RhCE-vävnadsmodellen. Denna ska omfatta men inte vara begränsad till följande: Uppgifter om huruvida kvalitetskontrolldata är godtagbara med avseende på historiska data om respektive sats.

— Uppgift om att testanläggningen har uppvisat kompetens i användningen av testmetoden inför rutinmässig användning genom ett test av kvalifikationskemikalier.

Acceptanskriterier för tester och testomgångar

— Medelvärden och acceptansintervall för positiva och negativa kontroller baserade på historiska data.

— Acceptabel variation mellan vävnadsreplikat för positiva och negativa kontroller.

— Acceptabel variation mellan vävnadsreplikat för testkemikalien.

Testförfarande

— Detaljerade uppgifter om testförfarandet.

— Doser av använda testkemikalier och kontrollämnen.

— Exponeringens varaktighet och temperatur, varaktighet på nedsänkning efter exponering och postexponeringsinkubation (om tillämpligt).

— Beskrivning av eventuella modifieringar av testförfarandet.

— Uppgifter om kontroller som använts för direkt MTT-reduktion och/eller färgade testkemikalier, om tillämpligt.

— Antal vävnadsreplikat som används per testkemikalie och kontroller (positiv kontroll, negativ kontroll, NSMTT, NSC_{living} och NSC_{killed}, om tillämpligt).

Resultat

— Tabell med data från enskilda testkemikalier och kontrollämnen för varje testomgång (inklusive upprepade experiment om tillämpligt) och mätningar för varje replikat, inklusive OD-värde eller MTT-formazantopparea, procentuell vävnadsviabilitet, genomsnittlig procentuell vävnadsviabilitet, skillnad mellan vävnadsreplikat eller SD och slutlig prediktion.

— Om tillämpligt, resultat från kontroller som använts för direkt MTT-reduktion och/eller färgade testkemikalier, inklusive OD-värde eller topparea för MTT-formazan, % NSMTT, % NSC_{living}, % NSC_{killed}, skillnad mellan vävnadsreplikat eller SD, slutlig korrekt procentuell vävnadsviabilitet och slutlig prediktion.

— Resultat som erhållits med testkemikalien (testkemikalierna) och kontrollämnena i förhållande till definierade acceptanskriterier för testomgången och testet som helhet.

— Beskrivning av övriga observerade effekter, till exempel färgning av vävnaderna av en färgad testkemikalie.

Diskussion kring resultaten

Slutsats

LITTERATUR

(1) FN (2015). FN:s globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, sjätte reviderade upplagan, New York och Genève: FN. Finns på http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Kapitel B.5 i denna bilaga, Akut ögonirritation/ögonkorrosion.

(3) Kapitel B.47 i denna bilaga, Testmetoden BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability) för identifiering av i) kemikalier som orsakar allvarlig ögonskada och ii) kemikalier för vilka det inte krävs klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada.

(4) Kapitel B.48 i denna bilaga, Testmetoden ICE (Isolated Chicken Eye test) för identifiering av i) kemikalier som orsakar allvarlig ögonskada och ii) kemikalier för vilka det inte krävs klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada.

(5) Kapitel B.61 i denna bilaga, Testmetoden fluoresceinläckage för identifiering av ämnen som är frätande och kraftigt irriterande för ögonen.

(6) Kapitel B.68 i denna bilaga, In vitro-testmetoden korttidsexponering (Short Time Exposure Test) för identifiering av i) kemikalier som orsakar allvarlig ögonskada och ii) kemikalier för vilka det inte krävs klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada.

(7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special issue 2010,261-266.

(8) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Finns på http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280.

(9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Finns på http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702.

(10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.

(11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.

(12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Finns på http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704.

(13) EC EURL ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Manuscript in preparation).

(14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. Journal of *Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377–390.

(15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

(16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(17) OECD (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.

(18) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.

(19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.

(20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. I: Salem, H., Katz, S.A. (red.), Alternative toxicological methods, CRC Press, s. 147-159.

(21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.

(22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476-1488.

(23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.

(24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

(25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.

(26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113–126.

(27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye irritation. I: *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N. och Maibach H.I. (red.), fjärde upplagan, s. 749–815. Washington, DC, Förenta staterna: Hemisphere Publishing Corporation.

(28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. I: Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D. (red.), sjunde upplagan s. 665-697. Withby, ON, Kanada: McGraw-Hill Ryerson.

(29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922-936.

(30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.

(31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115-130.

(32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610-2625.

(33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41-54.

(34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Finns på [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

(35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SKINETHIC™ HCE Eye Irritation Test (EITL för flytande ämnen, EITS för fasta ämnen) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Finns på https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index.

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.

(37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.

(38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Maj 2001. Finns på http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf.

(39) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.

Tillägg 1

DEFINITIONER

Noggrannhet: Ett mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Det är en relevansaspekt och ett mått på testmetodens prestanda. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (18).

Referenskemikalie: En kemikalie som används som en standard för jämförelse med en testkemikalie. En referenskemikalie ska ha följande egenskaper: i) konsekvent och pålitligt medel för dess identifiering och karakterisering, ii) strukturell, funktionell och/eller kemisk likhet eller produktklass-likhet med den/de kemikalie(r) som testas, iii) kända fysikaliskkemiska egenskaper, iv) stödjande data om kända effekter, och v) känd styrka inom det önskade responsområdet.

Nedifrån och upp-strategi: Stegvis metod som tillämpas på en testkemikalie som inte tros kräva klassificering och märkning för ögonirritation eller allvarlig ögonskada; det första steget är att skilja kemikalier som inte behöver klassificeras och märkas (negativt utfall) från andra kemikalier (positivt utfall).

Kemikalie: Ett ämne eller en blandning.

Konkordans: se ”Noggrannhet”.

Hornhinna (kornea): Den transparenta delen av ögonglobens framsida, som täcker iris och pupillen och släpper in ljus i ögat.

CV: Variationskoefficient (Coefficient of Variation).

Dev: Avvikelse (deviation).

EIT: Ögonirritationstest (Eye Irritation Test).

EURL ECVAM: EU:s referenslaboratorium för alternativ till djurförsök (European Union reference laboratory for alternatives to animal testing).

Ögonirritation: Förändringar som uppstår i ögat efter applicering av en testkemikalie på ögats främre yta och som är fullt reversibla inom 21 dagar från appliceringen. Utbytbart mot ”Reversibla effekter på ögat” och ”GHS-/CLP-kategori 2”.

ET_{50}: Den exponeringstid som krävs för att minska vävnadsviabiliteten med 50 % vid applicering av en referenskemikalie med en fastställd, fast koncentration.

Falskt negativt värde: Den andel av alla positiva ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som negativa. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

Falskt positivt värde: Den andel av alla negativa ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som positiva. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

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

HCE: SkinEthic™ Human Corneal Epithelium, humant hornhinneepitel.

HPLC: Högupplösande vätskekromatografi.

IC_{50}: Koncentration vid vilken en referenskemikalie minskar vävnadens viabilitet med 50 % efter en fast exponeringstid (t.ex. 30 minuters behandling med SDS).

Infinit dos: En mängd testkemikalie som appliceras på RhCE-vävnaden och som överstiger den mängd som krävs för att helt täcka epitelets yta med ett jämnt lager.

Irreversibla effekter på ögat: Se ”Allvarlig ögonskada”.

LLOQ: Nedre kvantifieringsgräns (Lower Limit of Quantification).

LogP: Logaritmen för fördelningskoefficienten för oktanol-vatten.

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

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

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

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

Negativ kontroll: Ett prov som innehåller ett testsystems alla komponenter och som behandlas med ett ämne känt för att inte inducera positiv respons från testsystemet. Detta prov hanteras tillsammans med testkemikaliebehandlade prover och andra kontrollprover och används för att fastställa 100 % vävnadsviabilitet.

Icke-klassificerad: Kemikalier som inte är klassificerade som ögonirriterande (GHS/CLP-förordningen kategori 2, GHS kategori 2A eller 2B) eller som orsakande allvarlig ögonskada (GHS/CLP-kategori 1). Utbytbart mot ”GHS-/CLP-kategori Ingen klassificering”.

NSC_{killed}: Icke-specifik färg i avdödade vävnader.

NSC_{living}: Icke-specifik färg i levande vävnader.

NSMTT: Icke-specifik MTT-reduktion (Non-Specific MTT).

OD: Optisk densitet

Prestandastandarder: Standarder, baserade på en validerad testmetod som ansetts vetenskapligt giltig, vilka utgör grunden för utvärdering av jämförbarheten hos en föreslagen testmetod som är mekanistiskt och funktionellt likartad. Följande ingår: i) testmetodens grundläggande komponenter, ii) en minimiförteckning med referenskemikalier som valts ut från de kemikalier som använts för att påvisa att den validerade testmetoden fungerar tillfredsställande och iii) de jämförbara nivåer av noggrannhet och tillförlitlighet, på grundval av vad som erhållits för den validerade testmetoden, som man bör kunna påvisa för den föreslagna testmetoden när den utvärderas med användning av minimiförteckningen med referenskemikalier (18).

Positiv kontroll: Ett prov som innehåller ett testsystems alla komponenter och som behandlas med ett ämne känt för att inducera positiv respons från testsystemet. Detta prov hanteras tillsammans med testkemikaliebehandlade prover och andra kontrollprover. För att säkerställa att variationer i den positiva kontrollens respons över tid kan bedömas, bör den positiva responsen inte vara alltför kraftfull.

Relevans: Beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida testet är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl man genom testet korrekt kan mäta och prediktera den biologiska effekt det gäller. Relevans omfattar också överväganden om en testmetods noggrannhet (konkordans) (18).

Tillförlitlighet: Mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tid, när den utförs med användning av samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier och repeterbarheten inom laboratorier (18).

Ersättningstest: Ett test utformat för att ersätta ett test som används rutinmässigt och som är godkänt för faroidentifiering och/eller riskbedömning och som har konstaterats ge motsvarande eller bättre skydd av människors eller djurs hälsa eller miljön, enligt det som är tillämpligt, jämfört med det godkända testet, för alla tänkbara testningssituationer och kemikalier (18).

Reproducerbarhet: Överensstämmelse mellan resultat som erhållits från upprepade tester av samma testkemikalie med användning av samma testprotokoll (se ”Tillförlitlighet”) (18).

Reversibla effekter på ögat: Se ”Ögonirritation”.

RhCE: Rekonstruerat humant hornhinnelikt epitel (Reconstructed human Cornea-like Epithelium).

Testomgång: En testomgång utgörs av att en eller flera testkemikalier testas parallellt med en negativ kontroll och en positiv kontroll.

SD: Standardavvikelse (Standard Deviation).

Känslighet: Den andel av alla positiva/aktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testet. Det är ett mått på noggrannheten hos en kategoriserande testmetod och är en viktig faktor vid bedömningen av en testmetods relevans (18).

Allvarlig ögonskada: Vävnadsskada i ögat eller kraftig synnedsättning som uppstår efter applicering av ett testämne på ögats främre yta och som inte är fullt reversibel inom 21 dagar från appliceringen. Utbytbart mot ”Irreversibla effekter på ögat” och ”GHS/CLP-kategori 1”.

Standardförfaranden: Formella, skriftliga förfaranden som i detalj beskriver hur särskilda rutiner och testspecifika laboratoriearbeten ska utföras (Standard Operating Procedure, SOP). De är obligatoriska enligt GLP (Good Laboratory Practice).

Specificitet: Den andel av alla negativa/inaktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testet. Det är ett mått på noggrannheten hos en kategoriserande testmetod och är en viktig faktor vid bedömningen av en testmetods relevans (18).

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

Test: Parallella tester av en enskild testkemikalie på minst två vävnadsreplikat enligt angivelser i relevant standardförfarande.

Vävnadsviabilitet: Parameter som mäter en cellpopulations totala aktivitet i en rekonstruerad vävnad som dess förmåga att reducera MTT, vilket, beroende på testets utformning och vilken endpoint som mäts, korrelerar till det totala antalet celler och/eller till cellernas viabilitet.

Uppifrån och ned-strategi: Stegvis metod som tillämpas på kemikalier som misstänks orsaka allvarlig ögonskada; det första steget är att skilja kemikalier som inducerar allvarlig ögonskada (positivt utfall) från andra kemikalier (negativt utfall).

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

Stegvis teststrategi: En sekventiell teststrategi som använder sig av olika testmetoder efter varandra. All befintlig information om en testkemikalie granskas vid varje steg, med användning av förfarandet med sammanvägd bedömning (weight of evidence) för att avgöra om det finns tillräckligt med information till hands för att besluta om faroklassificering innan man går vidare till nästa steg i strategin. Om testkemikaliens potential/styrka att framkalla skada kan fastställas utifrån befintlig information vid ett givet steg behövs ingen ytterligare testning (18).

ULOQ: Övre kvantifieringsgräns (Upper Limit of Quantification).

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

GHS-/CLP-kategori 1: Se ”Allvarlig ögonskada”.

GHS-/CLP-kategori 2: Se ”Ögonirritation”.

GHS-/CLP-kategori Ingen klassificering: Kemikalier som inte uppfyller kraven för att klassificeras enligt GHS-/CLP-kategori 1 eller 2 (eller GHS-kategori 2A eller 2B). Utbytbart mot Icke-klassificerad.

UPLC: Ultra-högupplösande vätskekromatografi.

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

Giltig testmetod: En testmetod som anses vara tillräckligt relevant och tillförlitlig för ett särskilt ändamål och är grundad på vetenskapligt sunda principer. En testmetod är aldrig giltig i absolut bemärkelse, utan endast i förhållande till ett fastställt ändamål (18).

Validerad testmetod: En testmetod för vilken valideringsstudier har genomförts för att fastställa relevans (inklusive noggrannhet) och tillförlitlighet för ett specifikt ändamål. Det är viktigt att notera att en validerad testmetod kanske inte är tillräckligt noggrann och tillförlitlig när det gäller ett visst föreslaget ändamål (18).

VRM: Validerad referensmetod.

VRM1: EpiOcular™ EIT anges som Validerad referensmetod 1.

VRM2: SkinEthic™ HCE EIT anges som Validerad referensmetod 2.

Sammanvägd bedömning: Ett förfarande där man bedömer styrkor och svagheter hos flera uppgifter för att nå fram till och motivera en slutsats huruvida ett testämne kan vara skadligt.

Tillägg 2

HUVUDSAKLIGA DELAR I DE RHCE-TESTER SOM HAR VALIDERATS FÖR IDENTIFIERING AV KEMIKALIER SOM INTE KRÄVER KLASSIFICERING ELLER MÄRKNING FÖR ÖGONIRRITATION ELLER ALLVARLIG ÖGONSKADA

Testdelar	EpiOcular™ EIT (VRM1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM2)	
Protokoll	Vätskor (pipetterbara vid 37 ± 1°C eller lägre temperaturer under 15 min.)	Ämnen i fast form (ej pipetterbara)	Vätskor och viskösa ämnen (pipetterbara)	Ämnen i fast form (ej pipetterbara)
Modellyta	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Antal vävnadsreplikat	Minst två	Minst två	Minst två	Minst två
Förkontroll av eventuell färginterferens	50 µl + 1 ml H_2O i 60 min. vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relativ luftfuktighet (ofärgade testkemikalier), eller 50 µl + 2 ml isopropanol blandade i 2–3 timmar vid rumstemperatur (färgade testkemikalier) → om testkemikaliens OD vid 570 ± 20 nm, efter subtraktion av OD för isopropanol eller vatten är > 0,08 (vilket motsvarar ungefär 5 % av den negativa kontrollens genomsnittliga OD-värde), bör anpassade kontroller med levande vävnad genomföras.	50 mg + 1 ml H_2O i 60 min. vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relativ luftfuktighet (ofärgade testkemikalier), och/eller 50 mg + 2 ml isopropanol blandade i 2–3 timmar vid rumstemperatur (färgade och ofärgade testkemikalier) → om testkemikaliens OD vid 570 ± 20 nm, efter subtraktion av OD för isopropanol eller vatten, är > 0,08 (vilket motsvarar ungefär 5 % av den negativa kontrollens genomsnittliga OD-värde), bör anpassade kontrolltester med levande vävnad genomföras.	10 µl + 90 µl H_2O blandade i 30 ± 2 min. vid rumstemperatur (RT, 18–28 °C) → om testkemikalien är färgad, bör anpassade kontroller med levande vävnad genomföras	10 mg + 90 µl H_2O blandade i 30 ± 2 min. vid rumstemperatur → om testkemikalien är färgad, bör anpassade kontroller med levande vävnad genomföras

Testdelar	EpiOcular™ EIT (VRM1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM2)	
Förkontroll av eventuell direkt MTT-reduktion	50 µl + 1 ml av 1 mg/ml MTT-lösning under 180 ± 15 min. vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relativ luftfuktighet → om lösningen blir blå/lila, bör anpassade kontroller med frysdödad vävnad utföras (50 µl sterilt avjoniserat vatten i MTT-lösning används då som negativ kontroll)	50 mg + 1 ml av 1 mg/ml MTT-lösning under 180 ± 15 min. vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relativ luftfuktighet → om lösningen blir blå/lila, bör anpassade kontrolltester med frysdödad vävnad utföras (50 µl sterilt avjoniserat vatten i MTT-lösning används då som negativ kontroll)	30 µl + 300 µl av 1 mg/ml MTT-lösning i 180 ± 15 min. vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relativ luftfuktighet → om lösningen blir blå/lila, bör anpassade kontroller med vattendödad vävnad utföras (30 µl sterilt avjoniserat vatten i MTT-lösning används då som negativ kontroll)	30 mg + 300 µl av 1 mg/ml MTT-lösning i 180 ± 15 min. vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relativ luftfuktighet → om lösningen blir blå/lila, bör anpassade kontroller med vattendödad vävnad utföras (30 µl sterilt avjoniserat vatten i MTT-lösning används då som negativ kontroll)
Förbehandling	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-fri DPBS i 30 ± 2 min. vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relativ luftfuktighet, skyddad från ljus.	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-fri DPBS i 30 ± 2 min. vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relativ luftfuktighet, skyddad från ljus.	—	—
Behandlingsdoser och applicering	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2)	10 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-fri DPBS + 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) För viskösa ämnen, använd ett nylonnät	30 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-fri DPBS + 30 ± 2 mg (60 mg/cm^2)
Exponering, tid och temperatur	30 min. (± 2 min.) i odlingsmedium vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relativ luftfuktighet	6 timmar (± 0,25 timmar) i odlingsmedium vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relativ luftfuktighet	30 min. (± 2 min.) i odlingsmedium vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relativ luftfuktighet	4 timmar (± 0,1 timmar) i odlingsmedium vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relativ luftfuktighet

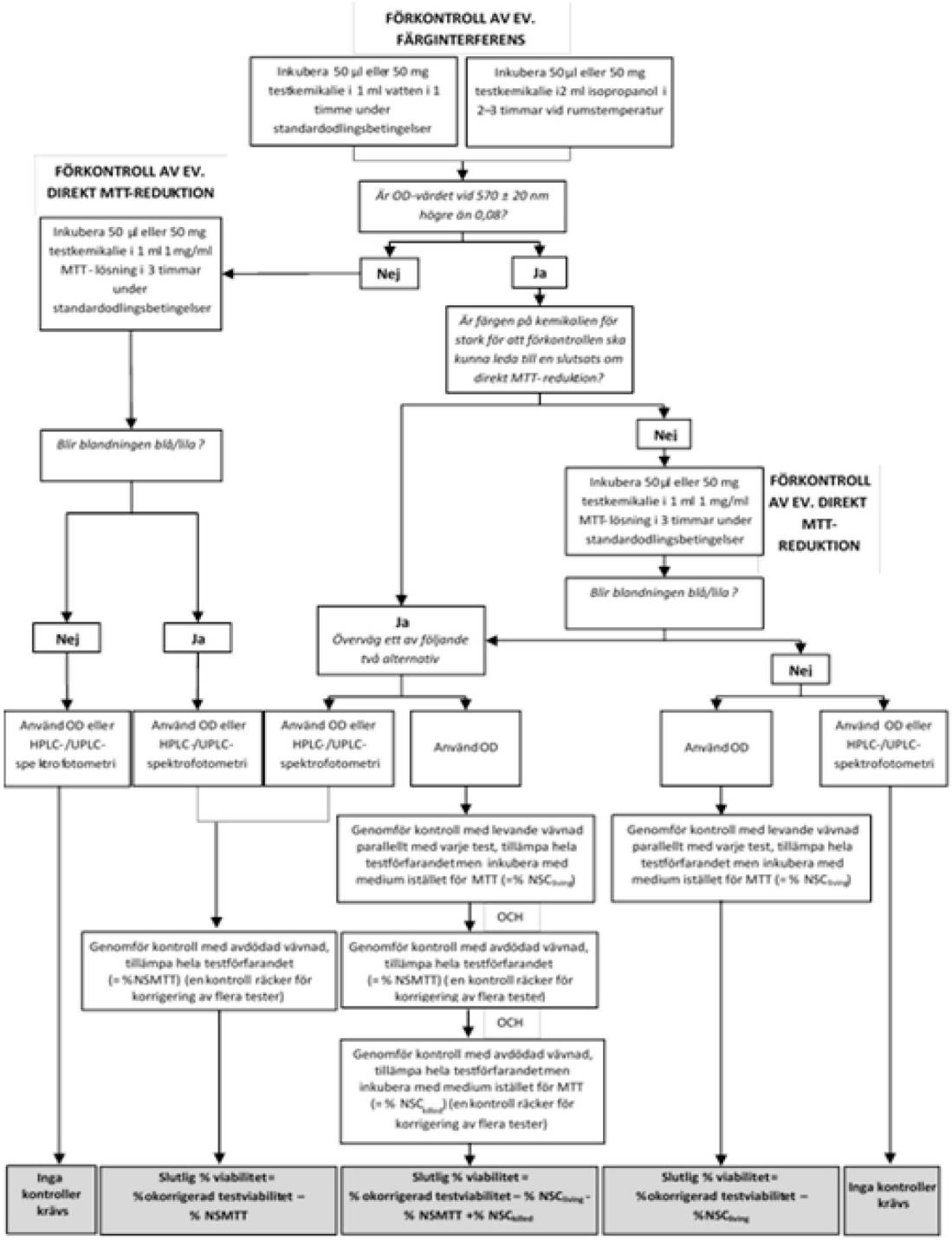
Testdelar	EpiOcular™ EIT (VRM1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM2)	
Sköljning vid rumstemperatur	3 gånger i 100 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-fri DPBS	3 gånger i 100 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-fri DPBS	20 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-fri DPBS	25 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-fri DPBS
Nedsänkning efter exponering	12 min. (± 2 min.) vid rumstemperatur i odlingsmedium	25 min. (± 2 min.) vid rumstemperatur i odlingsmedium	30 min. (± 2 min.) vid 37 °C, 5 % CO_2, 95 % relativ luftfuktighet, i odlingsmedium	30 min. (± 2 min.) vid rumstemperatur i odlingsmedium
Inkubation efter exponering	120 min. (± 15 min.) i odlingsmedium vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relativ luftfuktighet	18 timmar (± 0,25 timmar) i odlingsmedium vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relativ luftfuktighet	Ingen	18 timmar (± 0,5 h) i odlingsmedium vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relativ luftfuktighet
Negativ kontroll	50 µl H_2O Testas parallellt	50 µl H_2O Testas parallellt	30 ± 2 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-fri DPBS Testas parallellt	30 ± 2 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-fri DPBS Testas parallellt
Positiv kontroll	50 µl metylacetat Testas parallellt	50 µl metylacetat Testas parallellt	30 ± 2µl metylacetat Testas parallellt	30 ± 2µl metylacetat Testas parallellt

Testdelar	EpiOcular™ EIT (VRM1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM2)	
MTT-lösning	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT-inkubation, tid och temperatur	180 min. (± 15 min.) vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relativ luftfuktighet	180 min. (± 15 min.) vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relativ luftfuktighet	180 min. (± 15 min.) vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relativ luftfuktighet	180 min. (± 15 min.) vid 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relativ luftfuktighet
Extraktionsmedel	2 ml isopropanol (extraktion från iläggets topp och botten genom att sticka hål på vävnaden)	2 ml isopropanol (extraktion av iläggets botten genom att sticka hål på vävnaden)	1,5 ml isopropanol (extraktion från iläggets topp och botten)	1,5 ml isopropanol (extraktion av iläggets botten)
Extraktion, tid och temperatur	2–3 timmar med skak (~120 rpm) vid rumstemperatur eller över natt vid 4–10 °C	2–3 timmar med skak (~120 rpm) vid rumstemperatur eller över natt vid 4–10 °C	4 timmar med skak (~120 rpm) vid rumstemperatur eller åtminstone över natt utan skak vid 4–10 °C	Minst 2 timmar med skak (~120 rpm) vid rumstemperatur
Avläsning av optisk densitet	570 nm (550–590 nm) utan referensfilter	570 nm (550–590 nm) utan referensfilter	570 nm (540–600 nm) utan referensfilter	570 nm (540–600 nm) utan referensfilter
Kvalitetskontroll av vävnaden	Behandling med 100 µl 0,3-volymprocentig Triton X-100 12,2 min. ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min.	Behandling med 100 µl 0,3-volymprocentig Triton X-100 12,2 min. ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min.	30 min. behandling med SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	30 min. behandling med SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

Testdelar	EpiOcular™ EIT (VRM1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM2)	
Acceptanskriterier	1. Genomsnittligt OD-värde för de vävnadsreplikat som behandlats med negativ kontroll ska vara > 0,8 och < 2,5. 2. Genomsnittlig viabilitet hos de vävnadsreplikat som exponerats för positiv kontroll under 30 min, uttryckt i procent av negativ kontroll, ska vara < 50 %. 3. Skillnaden i viabilitet mellan två vävnadsreplikat ska vara mindre än 20 %.	1. Genomsnittligt OD-värde för de vävnadsreplikat som behandlats med negativ kontroll ska vara > 0,8 och < 2,5. 2. Genomsnittlig viabilitet hos de vävnadsreplikat som exponerats för positiv kontroll under 6 timmar, uttryckt i procent av negativ kontroll, ska vara < 50 %. 3. Skillnaden i viabilitet mellan två vävnadsreplikat ska vara mindre än 20 %.	1. Genomsnittligt OD-värde för de vävnadsreplikat som behandlats med negativ kontroll ska vara > 1,0 och ≤ 2,5. 2. Genomsnittlig viabilitet hos de vävnadsreplikat som exponerats för positiv kontroll under 30 min, uttryckt i procent av negativ kontroll, ska vara ≤ 30 %. 3. Skillnaden i viabilitet mellan två vävnadsreplikat ska vara mindre än 20 %.	1. Genomsnittligt OD-värde för de vävnadsreplikat som behandlats med negativ kontroll ska vara > 1,0 och ≤ 2,5. 2. Genomsnittlig viabilitet hos de vävnadsreplikat som exponerats för positiv kontroll under 4 timmar, uttryckt i procent av negativ kontroll, ska vara ≤ 20 %. 3. Skillnaden i viabilitet mellan två vävnadsreplikat ska vara mindre än 20 %.

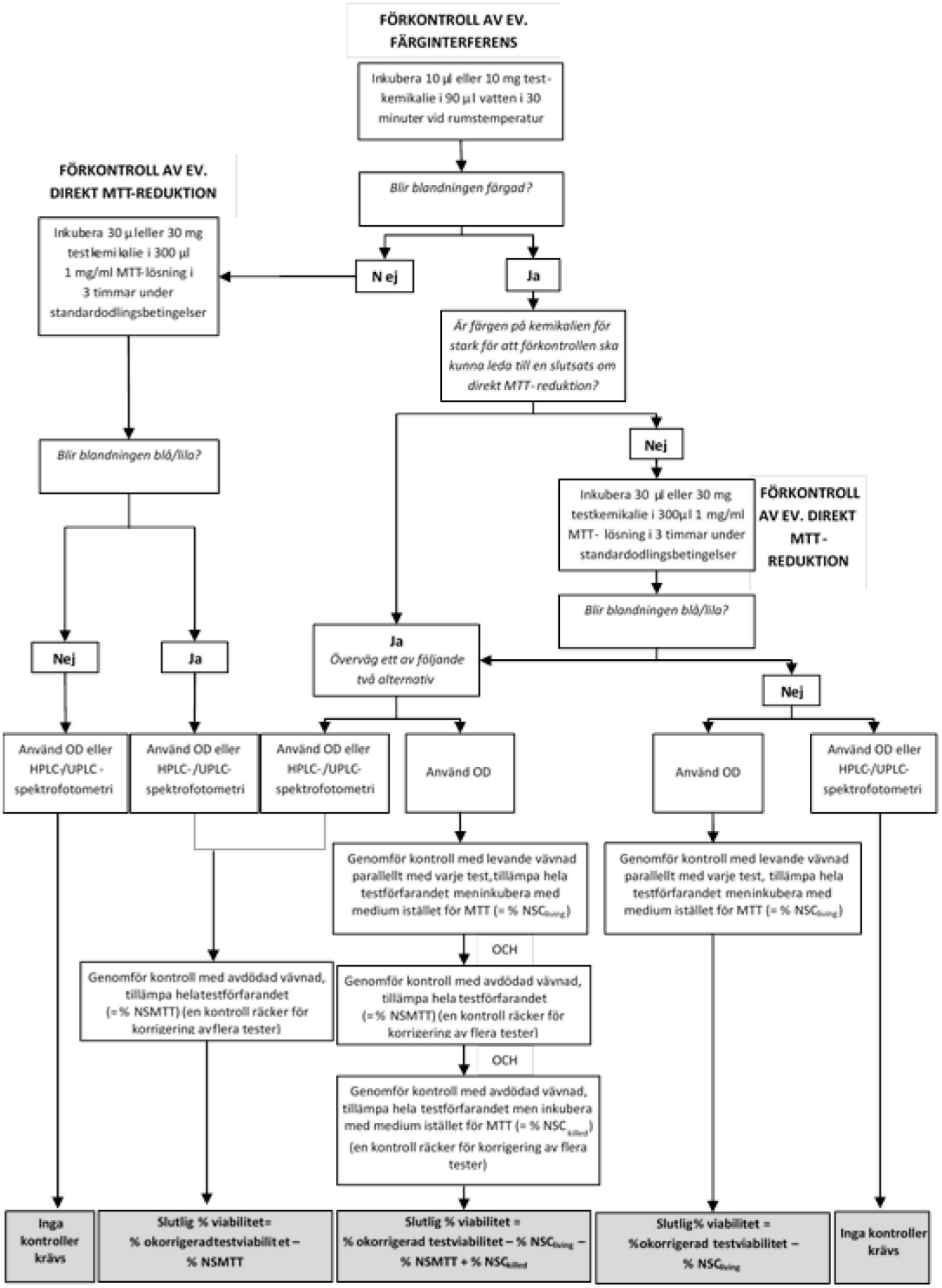
Tillägg 3

ILLUSTRERANDE FLÖDESSCHEMA SOM GER VÄGLEDNING I HUR MAN IDENTIFIERAR OCH HANTERAR DIREKT MTT-REDUCERANDE ÄMNEN OCH/ELLER FÄRGINTERFERERANDE KEMIKALIER, BASERAT PÅ STANDARDFÖRFARANDET FÖR VRM1



Tillägg 4

ILLUSTRERANDE FLÖDESSCHEMA SOM GER VÄGLEDNING I HUR MAN IDENTIFIERAR OCH HANTERAR DIREKT MTT-REDUCERANDE ÄMNEN OCH/ELLER FÄRGINTERFERERANDE KEMIKALIER, BASERAT PÅ STANDARDFÖRFARANDET FÖR VRM2



Tillägg 5

NYCKELPARAMETRAR OCH ACCEPTANSKRITERIER FÖR KVALIFICERING AV ETT SPEKTROFOTOMETRISKT HPLC-/UPLC-SYSTEM FÖR MÄTNING AV MTT-FORMAZAN EXTRAHERAD FRÅN RHCE-VÄVNAD

Parameter	Protokoll baserat på FDA-vägledning (36) (38)	Acceptanskriterier
Selektivitet	Analys av isopropanol, levande blankprov (isopropanolextrakt från levande RhCE-vävnad utan någon behandling), dött blankprov (isopropanolextrakt från avdödad RhCE-vävnad utan någon behandling), och av ett färgämne (t.ex. metylenblått)	$Area_{interference}$ ≤ 20 % av $area_{LLOQ}$ ([1])
Precision	Kvalitetskontroller (dvs. MTT-formazan vid 1,6 µg/ml, 16 µg/ml och 160 µg/ml) i isopropanol (n = 5)	CV ≤ 15 % eller ≤ 20 % för LLOQ
Noggrannhet	Kvalitetskontroller i isopropanol (n = 5)	% Dev ≤ 15 % eller ≤ 20 % för LLOQ
Matriseffekt	Kvalitetskontroller i levande blankprov (n = 5)	85 % ≤ % matriseffekt ≤ 115 %
Överföring	Analys av isopropanol mot en ULOQ ([2])-standard	$Area_{interference}$ ≤ 20 % av $area_{LLOQ}$
Reproducerbarhet (inom en dag)	Tre oberoende kalibreringskurvor (baserade på 6 konsekutiva 1/3-spädningar av MTT-formazan i isopropanol med början vid ULOQ, dvs. 200 µg/ml); Kvalitetskontroller i isopropanol (n = 5)	Kalibreringskurvor: % Dev ≤ 15 % eller ≤ 20 % för LLOQ Kvalitetskontroller: % Dev ≤ 15 % och CV ≤ 15 %
Reproducerbarhet (mellan dagar)	Dag 1: En kalibreringskurva och kvalitetskontroller i isopropanol (n = 3) Dag 2: En kalibreringskurva och kvalitetskontroller i isopropanol (n = 3) Dag 3: En kalibreringskurva och kvalitetskontroller i isopropanol (n = 3)	
Kortidsstabilitet för MTT-formazan i RhCE-vävnadsextrakt	Kvalitetskontroller i levande blankprov (n = 3), analyserade på beredningsdagen och efter 24 timmars förvaring i rumstemperatur	% Dev ≤ 15 %
Långtidsstabilitet för MTT-formazan i RhCE-vävnadsextrakt, om det krävs	Kvalitetskontroller i levande blankprov (n = 3), analyserade på beredningsdagen och efter några dygns förvaring i −20 °C	% Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: Nedre kvantifieringsgräns (Lower Limit of Quantification) fastställd att täcka 1–2 % vävnadsviabilitet, det vill säga 0,8 µg/ml.
([2]) ULOQ: Övre kvantifieringsgräns (Upper Limit of Quantification) fastställd att åtminstone vara två gånger högre än den högsta förväntade MTT-formazan-koncentrationen i isopropanolextrakt från negativa kontroller (~70 µg/ml i VRM), det vill säga 200 µg/ml.

B.70 ***IN VITRO*-TESTER MED HUMAN REKOMBINANT ÖSTROGENRECEPTOR (hrER) FÖR ATT DETEKTERA KEMIKALIER MED BINDNINGSAFFINITET TILL ÖSTROGENRECEPTOR**

ALLMÄN INLEDNING

OECD:s prestandabaserade testriktlinje

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 493 (2015). Testriktlinje 493 är en prestandabaserad testriktlinje (PBTG) som beskriver metodologin för in vitro-tester med humant rekombinant material för att detektera ämnen med bindningsaffinitet till östrogenreceptor (hrER-bindningstester). Den består av två mekanistiskt och funktionellt likartade tester för identifiering av ämnen som binder till östrogenreceptor α (dvs. ERα) och ska underlätta utvecklingen av nya, liknande eller modifierade tester som överensstämmer med de principer för validering som fastställts i OECD:s vägledningsdokument *Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment* (1). De fullständigt validerade referenstestmetoder (tilläggen 2 och 3) som ligger till grund för denna prestandabaserade riktlinje är

— Freyberger-Wilsons (FW) in vitro-test av östrogenreceptorbindning (östrogenreceptor, ER) med human, rekombinant fullängds-ERα (2), och

— Chemical Evaluation and Research Institutes (CERI) in vitro-test av östrogenreceptorbindning med humant, rekombinant, ligandbindande domänprotein (2).

Prestandastandarder (PS) (3) finns tillgängliga för att underlätta utvecklingen och valideringen av liknande testmetoder för samma faro-endpoint och möjliggöra tillägg till PBTG 493 vid lämplig tidpunkt så att nya liknande tester kan fogas till en uppdaterad PBTG. Men liknande tester kommer att läggas till först efter OECD:s granskning och godkännande av att prestandastandarderna uppfylls. De tester som ingår i TG 493 kan användas utan förbehåll för att bemöta OECD-medlemsländers krav på testresultat för östrogenreceptorbindning genom att dra nytta av OECD:s ömsesidiga acceptans av data.

Bakgrund och principer för de tester som ingår i denna testmetod

2. OECD inledde en högprioriterad verksamhet under 1998 för att se över befintliga, och ta fram nya, testriktlinjer för screening och testning av potentiellt hormonstörande kemikalier. OECD:s begreppsram för provning och bedömning av potentiellt hormonstörande kemikalier reviderades 2012. De ursprungliga och reviderade ramarna ingår som bilagor i *Guidance document on standardised test guidelines for evaluating chemicals for endocrine disruption* (4). Ramen har fem nivåer, vilka motsvarar olika nivåer av biologisk komplexitet. De ER-bindningstester som beskrivs i denna testmetod ligger på nivå 2, vilken omfattar in vitro-tester som ger data om utvalda hormonella mekanism(er)/signalväg(ar) Denna testmetod är avsedd för in vitro-tester av receptorbindning som är utformade för att identifiera ligander till den humana östrogenreceptorn alfa (ERα).

3. Relevansen hos in vitro-ER-bindningstestet för biologisk funktion har påvisats tydligt. ER-bindningstester är utformade för att identifiera kemikalier som har potential att störa östrogenhormonsignalvägen och har använts i stor omfattning under de två senaste decennierna för att karakterisera ER-distributionen i olika vävnader samt för att identifiera ER-agonister/antagonister. Dessa tester återspeglar ligand–receptorinteraktionen som är det inledande steget i östrogensignalvägen och är avgörande för reproduktiva funktioner hos alla ryggradsdjur.

4. Interaktionen mellan östrogener och östrogenreceptorer kan påverka transkriptionen av östrogenkontrollerade gener och inducera icke-genomiska effekter, vilka kan leda till induktion eller inhibering av cellulära processer, inklusive de som behövs för celldelning, normal fosterutveckling och reproduktion (5) (6) (7). En störning av normala östrogensystem kan leda till skadliga effekter på normal utveckling (ontogenes), reproduktionshälsa och reproduktionssystemets tillstånd. Olämplig ER-signalering kan leda till sådana effekter som ökad risk för hormonberoende cancer, nedsatt fertilitet samt förändringar i fostertillväxt och fosterutveckling (8).

5. In vitro-bindningstester baseras på en direkt interaktion mellan ett ämne och en specifik, gentranskriptionsreglerande ligandbindningsplats på receptorn. Den viktigaste delen av östrogenreceptor alfa-bindningstestet med humant rekombinant östrogen (hrERα) mäter förmågan hos radioaktivt inmärkt ligand ([^{3}H]-17β-östradiol) att binda till ER i närvaron av ökande koncentrationer av testkemikalie (dvs. konkurrerande ligand). Testkemikalier med hög affinitet för ER konkurrerar med den radioaktivt inmärkta liganden vid en lägre koncentration än de kemikalier som har lägre affinitet för receptorn. Detta test består av två huvuddelar: ett mättnadsbindningsexperiment för att karakterisera receptor–ligandinteraktionsparametrar och fastställa ER-specificitet, följt av ett kompetitivt bindningsexperiment som karakteriserar konkurrensen mellan en testkemikalie och en radioaktivt inmärkt ligand vid inbindning till ER.

6. Valideringsstudier av CERI- och FW-bindningstesterna har visat att de är relevanta och tillförlitliga för det avsedda syftet (2).

7. Definitioner och förkortningar som används i denna testmetod beskrivs i tillägg 1.

Omfattning och begränsningar för receptorbindningstester

8. Dessa tester föreslås för screening- och prioriteringssyften men kan också ge information för en molekylär inledande händelse (Molecular Initiation Event, MIE) som kan användas vid en strategi med sammanvägd bedömning. Med hjälp av dem kan kemisk bindning till den ERα-ligandbindande domänen undersökas i ett in vitro-system. Därför ska resultat inte direkt extrapoleras till det intakta hormonella systemets komplexa signalering och reglering in vivo.

9. Inbindningen av den naturliga liganden, 17β-östradiol, är det inledande steget i en serie molekylära händelser som aktiverar transkription av målgener och i slutänden kulminerar i fysiologiska förändringar (9). Därför betraktas bindning till den ERα-ligandbindande domänen som en av nyckelmekanismerna i ER-medierad hormonell störning (Endocrine Disruption, ED), även om det finns andra mekanismer genom vilka hormonell störning kan uppstå, inklusive i) interaktioner med andra platser på ERα än den ligandbindande fickan, ii) interaktioner med andra receptorer som är relevanta för östrogensignalering, ER-β och G-proteinkopplad östrogenreceptor, andra receptorer och enzymatiska system inom det hormonella systemet, iii) hormonsyntes, iv) metabol aktivering och/eller deaktivering av hormoner, v) transport av hormoner till målvävnader och vi) utsöndring av hormoner från kroppen. Inget av testerna i denna testmetod fokuserar på någon av dessa verkningsmekanismer.

10. Denna testmetod är inriktad på olika ämnens förmåga att binda till human ERα och skiljer inte mellan agonister respektive antagonister till ERα. Dessa tester är inte inriktade på vare sig vidare nedströms händelser, som gentranskription, eller fysiologiska förändringar. Med hänsyn till att endast monokomponentämnen användes i valideringen har inte möjligheten att testa blandningar inte behandlats. Teoretiskt är testerna emellertid tillämpliga på testning av multikomponentämnen och blandningar. Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett tillsynsändamål bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag.

11. Cellfria receptorsystem har ingen inneboende metabol förmåga och har inte validerats tillsammans med metabola enzymsystem. Men det kan vara möjligt att utforma en studie som inkorporerar metabol aktivitet, det fordrar dock ytterligare valideringsarbete.

12. Kemikalier som kan denaturera proteinet (dvs. receptorproteinet), som ytaktiva ämnen eller kemikalier som kan ändra testbuffertens pH, kan eventuellt inte testas eller kan endast testas vid koncentrationer där sådan interaktion inte äger rum. I övrigt begränsas koncentrationsintervallet inom vilket testkemikalien kan testas av kemikaliens löslighet i testbufferten.

13. Notera att i tabell 1 anges testresultaten för de 24 ämnen som testades i de båda fullständigt validerade testerna som beskrivs i denna testmetod. Av dessa ämnen har 17 klassificerats som ER-bindande och 6 som icke-bindande utifrån publicerade rapporter, inklusive in vitro-tester för ER-transkriptionsaktivering och/eller det uterotrofa testet (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). För de data som sammanfattas i tabell 1 var det nästan 100 % överensstämmelse mellan de två testerna kring klassificeringen av alla ämnen upp till 10^{-4} M, och varje ämne identifierades korrekt som antingen ER-bindande eller icke ER-bindande. Ytterligare information om denna grupp av ämnen, liksom andra ämnen som testats i ER-bindningstesterna i valideringsstudierna ges i prestandastandarderna för hrER-bindningstestet (3) tillägg 2 (tabell 1, 2 och 3).

Tabell 1

Indelning av ämnen som ER-bindande eller icke ER-bindande, efter att de testats i FW- och CERI-hrER-bindningstesterna med jämförelse av förväntad respons

	Ämnesnamn	CAS-nummer	Förväntad respons	FW-test		CERI-test		MESH, kemikalie-klass	Produktklass
				Koncentrations- intervall (M)	Klassificering	Koncentrations- intervall (M)	Klassificering		
1	17β-östradiol	50-28-2	*Bindare*	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Bindare	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Bindare	Steroid	Humant/veterinärt läkemedel
2	Noretynodrel	68-23-5	*Bindare*	3×10^{-9}–30×10^{-4}	Bindare	3×10^{-9}–30×10^{-4}	Bindare	Steroid	Humant/veterinärt läkemedel
3	Noretindron	68-22-4	*Bindare*	3×10^{-9}–30×10^{-4}	Bindare	3×10^{-9}–30×10^{-4}	Bindare	Steroid	Humant/veterinärt läkemedel
4	Di-*n*-butylftalat	84-74-2	*Icke-bindare* (*)	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Icke-bindare (**) ()	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Icke-bindare (**) ()	Kolväte (cykliskt), ester	Mjukgörare, kemisk intermediär
5	DES (dietylstilbestrol)	56-53-1	*Bindare*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	Kolväte (cykliskt), fenol	Humant/veterinärt läkemedel
6	17α-etynylöstradiol	57-63-6	*Bindare*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	Steroid	Humant/veterinärt läkemedel
7	Meso-hexestrol	84-16-2	*Bindare*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	Kolväte (cykliskt), fenol	Humant/veterinärt läkemedel
8	Genistein	446-72-0	*Bindare*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	Kolväte (heterocykliskt), flavonoid	Naturprodukt
9	Equol	531-95-3	*Bindare*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	Fytoöstrogenmetabolit	Naturprodukt
10	Butylparaben (*n*-butyl-4-hydroxibensoat)	94-26-8	*Bindare*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	Paraben	Konserveringsmedel

	Ämnesnamn	CAS-nummer	Förväntad respons	FW-test		CERI-test		MESH, kemikalie-klass	Produktklass
				Koncentrations- intervall (M)	Klassificering	Koncentrations- intervall (M)	Klassificering		
11	Nonylfenol (blandning)	84852-15-3	*Bindare*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	Alkylfenol	Intermediär
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*Bindare*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	Organisk klorförening	Insekticid
13	Kortikosteron	50-22-6	*Icke-bindare* (*)	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Icke-bindare	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Icke-bindare	Steroid	Naturprodukt
14	Zearalenon	17924-92-4	*Bindare*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	Kolväte (heterocykliskt), lakton	Naturprodukt
15	Tamoxifen	10540-29-1	*Bindare*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	Kolväte (cykliskt)	Humant/veterinärt läkemedel
16	5α-dihydrotestosteron	521-18-6	*Bindare*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	Steroid, icke-fenolisk	Naturprodukt
17	Bisfenol A	80-05-7	*Bindare*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	Fenol	Kemisk intermediär
18	4-*n*-heptylfenol	1987-50-4	*Bindare*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Tvetydig [a]	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	Alkylfenol	Intermediär
19	Kepon (klordekon)	143-50-0	*Bindare*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	Kolväten (halogenerad)	Bekämpningsmedel
20	Bens(a)antracen	56-55-3	*Icke-bindare*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Icke-bindare [b]	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Icke-bindare [b]	Aromatiskt kolväte	Intermediär
21	Enterolakton	78473-71-9	*Bindare*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Bindare	Fytoöstrogen	Naturprodukt
22	Progesteron	57-83-0	*Icke-bindare* (*)	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Icke-bindare	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Icke-bindare	Steroid	Naturprodukt

	Ämnesnamn	CAS-nummer	Förväntad respons	FW-test		CERI-test		MESH, kemikalie-klass	Produktklass
				Koncentrations- intervall (M)	Klassificering	Koncentrations- intervall (M)	Klassificering		
23	Oktyltrietoxisilan	2943-75-1	*Icke-bindare*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Icke-bindare	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Icke-bindare	Silan	Ytbehandlingsmedel
24	Atrazin	1912-24-9	*Icke-bindare* (*)	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Icke-bindare	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Icke-bindare	Heterocykliskt ämne	Ogräsbekämpningsmedel

(*) Löslighetsgräns < 1×10^{-4} M.

(**) Användningen och klassificeringen av di-n-butylftalat (DBP) som en icke-bindare baserades på tester upp till 10^{-4} M eftersom ämnet hade noterats som olösligt vid 10^{-3} M (t.ex. turbiditet) i en del laboratorier under pre-valideringsstudier.

(+) Under valideringsstudien testades di-*n*-butylftalat (DBP) som ett kodat testämne i koncentrationer upp till 10^{-3} M. Under dessa förhållanden observerades vid några laboratorier antingen en minskning i radioligandbindning vid den högsta koncentrationen (10^{-3} M) och/eller en tvetydig kurvanpassning. För dessa testomgångar klassificerades DBP som ”tvetydig” eller ”bindare” i 3/5 av de laboratorier som använde CERI-testet och 5/6 av de laboratorier som använde FW-testet (se referens 2), avsnitt IV.B. 3 a, b och VI.A).

(a) Klassificeringen överensstämde inte med förväntad klassificering. Klassificeringen av 4-*n*-heptylfenol som ”tvetydig” eller ”icke-bindare” av 3/5 av laboratorierna gav en genomsnittlig klassificering som tvetydig. En närmare undersökning visade att detta berodde på begränsningar i kemisk löslighet vilka förhindrade upprättande av en fullständig bindningskurva.

(b) Under valideringsstudien omklassificerades bens(a)antracen som icke-bindare (dvs. negativ) baserat på publicerad litteratur som visade att den östrogena aktivitet in vitro som rapporterats för detta ämne (16) främst uppkommer genom metabol aktivering (17)(18). Enzymatisk metabol aktivering av ämnet förväntas inte i de cellfria hrER-bindningstester som användes i denna valideringsstudie mellan laboratorier. Därför är den korrekta klassificeringen av detta ämne ”icke-bindare” när det används under de experimentella förhållanden som gäller för FW- och CERI-tester.

hrER-BINDNINGSTESTETS DELAR

Viktiga testdelar

14. Denna testmetod gäller tester som använder en ER-receptor och en lämpligt stark receptorligand som kan användas som en markör/spårsubstans i testet och kan trängas bort vid högre koncentrationer av en testkemikalie. I bindningstester ingår två huvuddelar: 1) mättnadsbindning och 2) kompetitiv bindning. Mättnadsbindningstestet används för att bekräfta receptorberedningarnas specificitet och aktivitet, medan den kompetitiva delen av experimentet används för att utvärdera testkemikaliens förmåga att binda till hrER.

Kontroller

15. Grunden för föreslagna parallella östrogenreferenser och kontroller bör beskrivas. Parallellt löpande kontroller (lösningsmedel [vehikel], positiv [ER-bindare, stark resp. svag affinitet], negativ [icke-bindare]), utifrån omständigheter, tjänar som en indikation på att testet fungerar under testbetingelserna och utgör en grund för jämförelser mellan experiment, vanligen ingår de bland acceptanskriterierna för ett visst experiment (1). Fullständiga koncentrationskurvor för östrogenreferens och kontroller (dvs. svag bindare resp. icke-bindare) ska placeras i en platta vid varje testomgång. Alla andra plattor ska innehålla: 1) en hög koncentration (ungefär fullständig bortträngning av radioaktivt inmärkt ligand) och en mellankoncentration (ungefär IC_{50}) av E2 respektive svag bindare i tripletter, 2) lösningsmedelskontroll och icke-specifik bindning, båda som tripletter.

Rutinmässig kvalitetskontroll

16. Rutinmässiga kvalitetskontroller ska utföras som beskrivits för varje test för att säkerställa att receptorerna är aktiva, kemikalier har rätt koncentrationer, toleransgränser förblir stabila genom flera upprepningar och för att bibehålla förmågan till att ge förväntade ER-bindningsresponser över tid.

Demonstration av laboratoriets kompetens

17. Innan okända kemikalier kan testas med något av testerna i denna testmetod ska varje laboratorium uppvisa kompetens i att använda testet genom att göra mättnadstester som bekräftar ER-beredningens aktivitet och specificitet, samt kompetitiva bindningstester med östrogenreferensen och kontroller (svag bindare och icke-bindare). Laboratoriet ska utifrån 3–5 oberoende experiment som genomförts under skilda dagar upprätta en historisk databas med resultat för östrogenreferensen och kontrollerna. Dessa experiment kommer att utgöra grunden för laboratoriets östrogenreferenser och historiska kontroller och kommer att användas som en delbedömning för godkännande av senare testomgångar.

18. Testsystemets responsivitet kommer också att bekräftas genom tester av de kvalifikationsämnen som anges i tabell 2. Förteckningen över kvalifikationsämnen är en undergrupp av de referensämnen som anges i prestandastandarderna för ER-bindningstester (3). Dessa ämnen är kommersiellt tillgängliga, representerar de klasser av kemikalier som vanligen förknippas med ER-bindande aktivitet och bildar ett lämpligt intervall av förväntad styrka på ER-bindning (dvs. stark till svag) och icke-bindning (dvs. negativa svar). Varje kvalifikationsämne ska testas i koncentrationer vilka täcker intervallet som anges i tabell 2. Minst tre experiment ska genomföras för varje ämne och resultaten ska överensstämma med förväntad kemisk aktivitet. Varje experiment ska utföras oberoende (dvs. med färska spädningar av receptor, kemikalier och reagens), med tre replikat för varje koncentration. Kompetens uppvisas genom korrekt klassificering (positiv/negativ) av alla kvalifikationsämnen. Kompetenstesterna ska utföras av varje laboratorietekniker i samband med att han/hon lär sig testförfarandet.

Tabell 2

Förteckning över kontroller och kvalifikationsämnen för kompetitiva bindningstester med hrER (1)

Nr	Ämnesnamn	CAS-nummer (2)	Förväntad respons (3) (4)	Testkoncentrationsintervall (M)	MeSH kemisk klass (5)	Produktklass (6)
			Kontroller (östrogenreferens, svag bindare, icke-bindare)			
1	17-östradiol	50-28-2	Bindare	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Steroid	Humant/veterinärt läkemedel
2	Noretynodrel (eller) Noretindron	68-23-5 (eller) 68-22-4	Bindare	3×10^{-9}–30×10^{-6}	Steroid	Humant/veterinärt läkemedel
3	Oktyltrietoxisilan	2943-75-1	Icke-bindare	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Silan	Ytbehandlingsmedel
			Kvalifikationsämnen (6)			
4	Dietylstilbestrol	56-53-1	Bindare	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Kolväte (cykliskt), fenol	Humant/veterinärt läkemedel
5	17α-etynylöstradiol	57-63-6	Bindare	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Steroid	Humant/veterinärt läkemedel
6	Meso-hexestrol	84-16-2	Bindare	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Kolväte (cykliskt), fenol	Humant/veterinärt läkemedel
7	Tamoxifen	10540-29-1	Bindare	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Kolväte (cykliskt)	Humant/veterinärt läkemedel
8	Genistein	446-72-0	Bindare	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Heterocykliskt ämne, flavonoid	Naturprodukt

Nr	Ämnesnamn	CAS-nummer (2)	Förväntad respons (3) (4)	Testkoncentrationsintervall (M)	MeSH kemisk klass (5)	Produktklass (6)
9	Bisfenol A	80-05-7	Bindare	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Fenol	Kemisk intermediär
10	Zearalonon	17924-92-4	Bindare	1×10^{-11}–1×10^{-3}	Heterocykliskt ämne, lakton	Naturprodukt
11	Butylparaben	94-26-8	Bindare	1×10^{-11}–1×10^{-3}	Karboxylsyra, fenol	Konserveringsmedel
12	Atrazin	1912-24-9	Icke-bindare	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Heterocykliskt ämne	Ogräsbekämpningsmedel
13	Di-n-butylftalat (DBP) (7)	84-74-2	Icke-bindare (8)	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Kolväte (cykliskt), ester	Mjukgörare, kemisk intermediär
14	Kortikosteron	50-22-6	Icke-bindare	1×10^{-11}–1×10^{-4}	Steroid	Naturprodukt

(1) Om ett kvalifikationsämne inte längre finns kommersiellt tillgängligt kan man använda ett ämne med samma ER-bindningsklassificering, jämförbar styrka och ur samma kemiska klass.
(2) Förkortningar: CAS-nummer: nummer i registret som förs av Chemical abstracts service.
(3) Klassificering som ERαα-bindare eller icke-bindare i valideringsstudien för CERI- och FW-hrER-bindningstester (2).
(4) ER-bindningsaktivitet baserades på amerikanska ICCVAM:s Background review documents (BRD) för ER-bindnings- och TA-tester (9) liksom på empiriska data och annan information från publicerade och refererade granskade studier (10) (11) (12) (13) (14) (15).
(5) Ämnena placerades i en eller flera kemiska klasser med användning av U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), som är ett internationellt erkänt standardiserat klassificeringssystem (se http://www.nlm.nih.gov/mesh).
(6) Ämnena placerades i en eller flera produktklasser med användning av databanken U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (se http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)
(7) DBP kan användas som alternativ icke-bindande kontroll och då testas med maxkoncentration om 10^{-4} M.
(8) Gränsen för detta ämnes löslighet är 10^{-4} M. Användningen och klassificeringen av di-n-butylftalat (DBP) som en icke-bindare baserar sig på tester upp till 10^{-4} M eftersom ämnet hade noterats som olösligt vid 10^{-3} M (t.ex. turbiditet) i en del laboratorier under pre-valideringsstudier.

Löslighetstester och fastställande av koncentrationsintervall för testkemikalier

19. Ett preliminärt test bör genomföras för att fastställa löslighetsgränsen för varje testkemikalie och för att identifiera lämpligt koncentrationsintervall att använda sig av under testet. Samtliga testkemikaliers respektive löslighetsgräns i lösningsmedlet ska fastställas initialt och vidare bekräftas under testbetingelser. Slutkoncentrationen i testet bör inte överstiga 1 mM. Lämpligt intervall söks med tester som utgörs av en lösningsmedelskontroll och åtta logaritmiska seriespädningar, där man börjar med maximal acceptabel koncentration (t.ex. 1 mM eller lägre, baserat på löslighetsgräns), och närvaron av grumlighet eller fällning. Koncentrationer i det andra och tredje experimenten bör anpassas för en bättre karakterisering av koncentration–responskurvan.

Acceptanskriterier för testomgångar

20. Godkännande eller avvisande av en testomgång baseras på utvärderingen av resultaten för den östrogenreferens och kontroll som används i varje experiment. För det första, för platta 1 ska kompletta koncentrationskurvor för referenskontrollerna från varje experiment motsvara prestandamätningarna med kurvanpassningsparametrar (t.ex. IC_{50} och Hill-koefficient [Hill slope]) utifrån resultaten som rapporteras för respektive protokoll för CERI- och FW-testerna (tillägg 2 och 3) och historiska kontrolldata från laboratoriet som genomför testet. Alla kontroller (östrogenreferens, svag bindare och icke-bindare) ska klassificeras korrekt vid varje experiment. För det andra ska man skatta överensstämmelsen hos kontrollerna på alla påföljande plattor med dem på platta 1. Vidare ska man använda ett tillräckligt intervall av testkemikaliens koncentration för att klart kunna beskriva toppen på kurvan för kompetitiv bindning. Variationen mellan replikat vid varje koncentration av testkemikalien, liksom mellan de tre oberoende testomgångarna, ska vara rimlig och vetenskapligt försvarbar. Förmågan att genomföra testet konsekvent ska uppvisas genom upprättande och underhåll av en historisk databas för östrogenreferensen och kontroller. Standardavvikelser (SD) eller variationskoefficienter (CV) för medelvärdena för referensöstrogen och kurvanpassningsparametrar för kontrollkurvor för svaga bindare från flera experiment kan användas som ett mått på reproducerbarhet inom laboratoriet. Yrkesmässigt omdöme ska tillämpas vid granskning av kontrollresultaten på plattan, från varje testomgång, liksom för varje testkemikalie.

Vidare ska följande principer kring acceptanskriterier tillämpas:

— Data ska vara tillräckliga för en kvantitativ skattning av ER-bindning.

— Testkoncentrationerna ska vara inom testkemikaliens löslighetsintervall.

Dataanalys

21. Det fastställda förfarandet för dataanalys av mättnad respektive kompetitiv bindning ska följa huvudprinciperna för karakterisering av receptor–ligand-interaktioner. Vanligen analyseras mättnadsbindningsdata med en icke-linjär regressionsmodell som tar hänsyn till total och icke-specifik bindning. En korrigering för ligandförbrukning (t.ex. Swillens, 1995 [19]) kan behövas vid fastställande av Bmax och Kd. Data från tester av kompetitiv bindning omvandlas oftast (t.ex. procent specifik bindning och testkemikaliekoncentration [log M]). Skattningar av log(IC_{50})-värdet för varje testkemikalie ska göras med hjälp av en lämplig programvara för icke-linjär kurvanpassning med anpassning till en fyraparameters Hill-ekvation. Efter en inledande analys ska kurvanpassningsparametrarna för bindningsdata tas fram samt en visuell granskning göras av hur väl den upprättade kurvan över kompetitiv bindning speglar bindningsdata. I en del fall kan ytterligare analys krävas för att erhålla bästa kurvanpassning (t.ex. genom att begränsa [constrain] kurvans topp och/eller botten, använda 10-procentsregeln, se tillägg 4 och referens 2 (avsnitt III.A.2).

22. Om testsystemet motsvarar acceptanskriterierna (punkt 20) är det en indikation på att testsystemet fungerar korrekt, men det säkerställer inte att ett specifikt test ger korrekta data. En upprepning av det första testets korrekta resultat är den bästa indikationen på att producerade data är korrekta.

Generella kriterier för tolkning av data

23. För närvarande finns ingen allmänt överenskommen metod för att tolka ER-bindningsdata. Men både kvalitativa (t.ex. bindare/icke-bindare) och/eller kvantitativa skattningar (t.ex. log[IC_{50}]-värde, relativ bindningsaffinitet [RBA] osv.) av hrER-medierad aktivitet bör baseras på empiriska data och gott vetenskapligt omdöme.

Testrapport

24. Testrapporten ska innehålla följande information:

Test

— Använt test.

Kontroll/referens/testkemikalie

— Källa, satsnummer, sista förbrukningsdag, om detta anges.

— Testkemikaliens stabilitet i sig, om den är känd.

— Löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet, om detta är känt.

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

Monokomponentämne

— fysikaliskt tillstånd, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Kemiska beteckningar, såsom IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, Smiles- eller InChI-kod, strukturformel, renhet, kemisk identitet för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.

Multikomponentämne, UVCB-ämnen och blandningar

— karakteriseras så långt som möjligt genom beståndsdelarnas kemiska identitet (se ovan), kvantitativa förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

Lösningsmedel/vehikel

— Karakterisering (typ, leverantör och sats).

— Motivering för val av lösningsmedel/vehikel.

— Testkemikaliens löslighet och stabilitet i lösningsmedlet/vehikeln, om dessa är kända.

Receptorer

— Källa till receptorer (leverantör, katalognr, sats, receptortyp, koncentration av aktiv receptor enligt leverantören, certifikat från leverantören).

— Karakterisering av receptorer (inklusive mättnadsbindningsresultat): Kd, Bmax.

— Förvaring av receptorer.

— Radioaktivt inmärkt ligand.

— Leverantör, katalognr, sats, specifik aktivitet.

Testbetingelser

— Löslighetsbegränsningar under testbetingelser.

— Bindningsbuffertens sammansättning.

— Receptorkoncentration.

— Koncentration av spårsubstans (dvs. radioaktivt inmärkt ligand).

— Testkemikaliens koncentration.

— Procent vehikel i slutligt test.

— Inkubationstemperatur och tid.

— Separationsmetod bunden/fri.

— Positiva och negativa kontroller/referensämnen.

— Kriterier för när tester ska anses som positiva, negativa eller tvetydiga.

Acceptanskontroll

— Faktiska värden för IC_{50} och Hill-koefficient (Hill slope) för parallella positiva kontroller/referensämnen.

Resultat

— Rådata och data för bunden/fri.

— Bekräftelsekontroll av denaturering, om tillämpligt.

— Om det finns tillgängligt, lägsta effektiva koncentration (LEC).

— RBA och/eller IC_{50}-värden, där det är lämpligt.

— Koncentration–responsförhållande, där det är möjligt.

— Eventuella statistiska analyser tillsammans med fel- och konfidensmått (t.ex. SEM, SD, CV eller 95 % CI) samt en beskrivning av hur dessa värden har erhållits.

Diskussion kring resultaten

— Applicering av 10-procentsregeln.

Slutsats

LITTERATUR

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.

(2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.

(3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.

(4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.

(5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: s. 20-6.

(6) Welboren W.J., m.fl. (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr.* Relat. Cancer., 16(4): s. 1073–89.

(7) Younes M. och Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol.* Lab. Med., 135(1): s. 63-6.

(8) Diamanti-Kandarakis m.fl. (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo Rev 30(4):293-342.

(9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH-publikation nr 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

(10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro,* 22(1): 225-231.

(13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.

(14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. s. 1–188.

(15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Letters, 146: 111-120.

(16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol*. Letters, 180: 213-221.

(17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 196: 58-67.

(18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835-848.

(19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6):1197-1203.

Tillägg 1

DEFINITIONER OCH FÖRKORTNINGAR

10-procentsregeln: Möjlighet att från analyserna utesluta datapunkter där replikatens medelvärde för procent specifikt bunden [^{3}H]-17β-östradiol är 10 % eller mer över det observerade medelvärdet vid en lägre koncentration (se tillägg 4).

Acceptanskriterier: Minimistandarder för experimentets prestanda avseende kontroller och referensstandarder. Alla acceptanskriterier ska uppfyllas för att ett experiment ska anses vara giltigt.

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

CF: The OECD Conceptual Framework for the Testing and Evaluation of Endocrine Disrupters (OECD:s begreppsram för provning och bedömning av hormonstörande ämnen).

Kemikalie: Ett ämne eller en blandning.

CV: Variationskoefficient (Coefficient of Variation).

E2: 17β-östradiol.

ED.: hormonstörning.

hERα: Human östrogenreceptor alfa.

ER: Östrogenreceptor.

Östrogen aktivitet: Kapaciteten hos en kemikalie att imitera 17β-östradiols förmåga att binda östrogenreceptorer. Bindning till hERα kan undersökas med denna testmetod.

IC_{50}: Halva maximalt effektiva koncentrationen för en inhiberande testkemikalie.

ICCVAM: The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (i Förenta staterna).

Reproducerbarhet mellan laboratorier: Ett mått på i hur stor utsträckning olika kvalificerade laboratorier kan producera kvalitativt och kvantitativt liknande resultat, med användning av samma protokoll och samma testämnen. Reproducerbarheten mellan laboratorier fastställs under förvalideringen och valideringen och indikerar i hur stor utsträckning ett test framgångsrikt kan överföras mellan laboratorier, även kallat inter-laborativ reproducerbarhet (1).

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

LEC: Lägsta effektiva koncentration (Lowest Effective Concentration) är den lägsta koncentration av testkemikalie som ger en respons (dvs. den lägsta koncentration av testkemikalie vid vilken induktionen statistiskt skiljer sig från parallell vehikelkontroll).

Me too-test: Ett vardagligt uttryck för ett test som strukturellt och funktionellt liknar en validerad och godtagen referenstestmetod. Kallas även ’liknande testmetod’.

PBTG: Prestandabaserad testriktlinje (Performance-Based Test Guideline)

Prestandastandarder: Standarder som baseras på en validerad testmetod och som utgör grunden för utvärdering av jämförbarheten hos ett föreslaget, mekanistiskt och funktionellt likartat test. Häri ingår 1) viktiga testdelar, 2) en minimiförteckning med referenskemikalier som valts ut från de kemikalier som har använts för att påvisa att den validerade testmetoden fungerar tillfredsställande och 3) de jämförbara nivåer av noggrannhet och tillförlitlighet, på grundval av vad som erhållits för den validerade testmetoden, som man bör kunna påvisa för det föreslagna testet när det utvärderas med användning av minimiförteckningen med referenskemikalier (1).

Kvalifikationsämnen: En undergrupp av referensämnen som ingår i prestandastandarderna som kan användas av laboratorier för att påvisa teknisk färdighet med en standardiserad testmetod. Bland urvalskriterierna för dessa ämnen ingår oftast att de representerar responsintervallet, är kommersiellt tillgängliga och att referensdata av hög kvalitet finns tillgängliga.

Kompetens: Påvisad förmåga att korrekt genomföra ett test, innan okända ämnen testas.

Referensöstrogen: 17ß-östradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referenstestmetod: De tester som PBTG 493 baserar sig på.

RBA: Relativ bindningsaffinitet. Ett ämnes RBA beräknas som andelen i procent av ämnets log(IC_{50})-värde i förhållande till 17β-östradiols log(IC_{50})-värde.

Relevans: Beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida detta förhållande är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl man genom testet korrekt kan mäta och prediktera den aktuella biologiska effekten. Relevans omfattar också överväganden om noggrannheten hos ett test (konkordans) (1).

Tillförlitlighet: Mått på i vilken utsträckning ett test kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tid, när den utförs enligt samma protokoll. Den bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier.

SD: Standardavvikelse (Standard Deviation).

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

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

Validering: Processen enligt vilken pålitlighet och relevans för en särskild strategi, metod, ett särskilt test, en särskild process eller bedömning etableras för ett fastställt syfte (1).

Tillägg 2

FREYBERGER-WILSONS IN VITRO-TESTER AV MÄTTNAD HOS RESPEKTIVE KOMPETITIV BINDNING TILL ÖSTROGENRECEPTOR (ERA) MED REKOMBINANT FULLÄNGDS-ERA

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR (SE ÄVEN ALLMÄN INLEDNING)

1. I detta in vitro-test av mättnad hos och kompetitiv bindning till östrogenreceptor (ERα) används human fullängds-ERαα-receptor (hrERα) som produceras i och isoleras från bakulovirusinfekterade insektsceller. Protokollet, som utvecklades av Freyberger och Wilson, prövades i en internationell valideringsstudie som involverade flera laboratorier (2) och vilken visade dess relevans och pålitlighet för det avsedda syftet.

2. Detta test är ett screeningförfarande för att identifiera ämnen som kan binda till fullängds-hrERα. Det används för att fastställa en testkemikalies förmåga att konkurrera med 17β-östradiol om att binda till hrERα. Kvantitativa testresultat kan omfatta IC_{50} (ett mått på den koncentration av testkemikalie som behövs för att tränga bort hälften av [^{3}H]-17β-östradiolen från hrERα) och testkemikaliernas relativa bindningsaffiniteter för hrERα, jämförda med den hos 17β-östradiol. För kemisk screening kan godtagbara kvalitativa testresultat omfatta klassificeringar av testkemikalier som antingen hrERα-bindare, icke-bindare eller tvetydiga, utifrån de kriterier som beskrivits för bindningskurvorna.

3. Testet använder en radioaktiv ligand, vilket kräver att laboratoriet har licens för att hantera radioaktiva material. Allt handhavande av radioisotoper och farliga kemikalier ska följa de regelverk och rutiner som föreskrivs av nationell lagstiftning.

4. Läs "A**LLMÄN INLEDNING**" och "h**rER-BINDNINGSTESTETS DELAR**" innan testet används för tillsynsändamål. Definitioner och förkortningar som används i denna testriktlinje beskrivs i tillägg 1.

TESTETS PRINCIP (SE ÄVEN ALLMÄN INLEDNING)

5. Bindningstestet med hrERα mäter förmågan hos radioaktivt inmärkt ligand ([^{3}H]-17β-östradiol) att binda till ER i närvaron av ökande koncentrationer av testkemikalie (dvs. konkurrerande ligand). Testkemikalier med hög affinitet för ER konkurrerar med den radioaktivt inmärkta liganden vid en lägre koncentration än de kemikalier som har lägre affinitet för receptorn.

6. Detta test består av två huvuddelar: ett mättnadsbindningsexperiment för att karakterisera receptor–ligandinteraktionsparametrar, följt av ett kompetitivt bindningsexperiment som karakteriserar konkurrensen mellan en testkemikalie och en radioaktivt inmärkt ligand vid inbindning till ER.

7. Mättnadsbindningsexperimentets syfte är att inför det kompetitiva bindningsexperimentet karakterisera en receptorsats med avseende på bindningsaffinitet och antal receptorer. Mättnadsbindningsexperimentet mäter, vid jämviktsförhållanden och en fast receptorkoncentration, östrogenreceptorns affinitet för dess naturliga ligand (mätt som dissociationskonstant, Kd) och koncentrationen av aktiva bindningsplatser (Bmax).

8. Det kompetitiva bindningsexperimentet mäter benägenheten hos ett ämne att konkurrera med [^{3}H]-17β-östradiol om att binda till ER. Affiniteten kvantifieras genom koncentrationen av testkemikalie som, vid jämvikt, hämmar 50 % av den specifika bindningen av [^{3}H]-17β-östradiol (kallad hämmande koncentration 50 %, eller IC_{50}). Detta kan också utvärderas med hjälp av den relativa bindningsaffiniteten (RBA, affiniteten jämförd med IC_{50} för östradiol som mäts separat i samma testomgång). Det kompetitiva bindningsexperimentet mäter bindningen av [^{3}H]-17β-östradiol vid en fast koncentration i närvaron av ett stort intervall (åtta tiopotenser) av testkemikaliekoncentrationer. Data anpassas sedan, där så är möjligt, till en form av Hill-ekvationen (Hill, 1910) som beskriver bortträngningen av den radioaktivt märkta liganden av en kompetitiv bindare som binder till en bindningsplats. Den utsträckning i vilken den radioaktivt inmärkta östradiolen trängs bort vid jämvikt används för att karakterisera testkemikalien som en bindare, en icke-bindare eller med tvetydig respons.

FÖRFARANDE

Fastställande av acceptabel proteinfunktion hos hrERα

9. Innan rutinmässiga tester av mättnad och kompetitiv bindning genomförs ska varje ny sats av hrERα visas fungera korrekt i det laboratorium där den ska användas. En tvåstegsprocedur bör användas för att kontrollera prestanda. Dessa steg är som följer:

— Utför ett mättnadsbindningstest med [^{3}H]-17β-östradiol för att fastställa specificitet och mättnad hos hrERα. Icke-linjär regressionsanalys av dessa data (t.ex. BioSoft, McPherson, 1985, Motulsky, 1995) och påföljande Scatchard-diagram ska dokumentera [^{3}H]-17β-östradiolens bindningsaffinitet för hrERα (Kd) samt antalet receptorer (Bmax) för varje sats av hrERα.

— Genomför ett kompetitivt bindningstest med hjälp av kontrollämnen (referensöstrogen (17β-östradiol)), en svag bindare (t.ex. noretynodrel eller noretindron) och en icke-bindare (oktyltrietoxisilan, OTES). Varje laboratorium ska upprätta en historisk databas för att dokumentera överensstämmelsen hos IC_{50} och andra relevanta värden för referensöstrogenet och svaga bindare, mellan olika experiment och olika hrERα-satser. Parametrarna för kontrollämnenas kurvor över kompetitiv bindning ska vara inom gränserna för 95-procentigt konfidensintervall (se tabell 1), vilka har tagits fram med data från laboratorier som deltog i valideringsstudien för detta test (2).

Tabell 1

Prestandakriterier framtagna för referensöstrogen och svag bindare, FW-hrER-bindningstest

Ämne	Parameter	Medelvärde [a]	Standardavvikelse (n)	95 % konfidensintervall [b]	
				Nedre gräns	Övre gräns
17β-östradiol.	Topp (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Botten (%)	0,29	1,25 (67)	–0,01	0,60
	Hill-koefficient (Hill slope)	–1,06	0,20 (67)	–1,11	–1,02
	Log(IC_{50}) (M)	–8,92 [c]	0,18 (67)	–8,97	–8,88
Noretynodrel	Topp (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Botten (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hill-koefficient (Hill slope)	–1,01	0,38 (68)	–1,10	–0,92
	Log(IC_{50}) (M)	–6,39	0,27 (68)	–6,46	–6,33
Noretindron [c]	Topp (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Botten (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hill-koefficient (Hill slope)	–1,41	0,32 (27)	–1,53	–1,28
	Log(IC_{50}) (M)	–5,73	0,27 (27)	–5,84	–5,62

[a] Medelvärde (n) ± standardavvikelse (Standard Deviation, SD) beräknades genom skattning av kurvanpassningsparametrar (fyraparameters Hill-ekvation) för kontrollomgångar som utförts av fyra laboratorier under valideringsstudien (se bilaga N i referens 2).

[b] Gränserna för 95-procentigt konfidensintervall anges som en vägledning för acceptanskriterier.

[c] Test av noretindron var valfritt för deluppgift 4 under valideringsstudien (se referens 2, deluppgift 4). Således beräknades medelvärdet ± SD (n) med hjälp av skattade kurvanpassningar (fyraparameters Hill-ekvation) för kontrollomgångar, utförda av två laboratorier. Intervallet för
IC_{50} *kommer att vara beroende av receptorberedningens Kd och koncentrationen av radioaktivt inmärkt ligand som används vid de olika laboratorierna. Lämplig justering för* IC_{50}*-intervallet, baserad på de betingelser som används för att genomföra testet, kommer att kunna godtas.*

Demonstration av laboratoriets kompetens

10. Se punkterna 17 och 18 och tabell 2 i ”h**rER-BINDNINGSTESTETS DELAR**” i denna testmetod. Varje test (mättnad och kompetitiv bindning) ska bestå av tre oberoende testomgångar (dvs. med nya spädningar av receptor, kemikalier och reagens) på olika dagar och varje omgång ska innehålla tre replikat.

Bestämning av hrERα-koncentration

11. Koncentrationen av aktiv receptor varierar något mellan satser och med förvaringsförhållanden. Därför ska koncentrationen av aktiv receptor som erhållits från leverantören fastställas. Detta ger tillämplig koncentration av aktiv receptor när testomgången ska göras.

12. Under förhållanden som motsvarar kompetitiv bindning (dvs. 1 nM [^{3}H]-östradiol), ska nominella koncentrationer om 0,25, 0,5, 0,75, respektive 1 nM receptor inkuberas i frånvaro (total bindning) och närvaro (icke-specifik bindning) av 1 μM ej inmärkt östradiol. Specifik bindning, beräknad som differensen av total och icke-specifik bindning, ritas i ett diagram mot den nominella receptorkoncentrationen. Den receptorkoncentration som ger specifika bindningsvärden motsvarande 20 % av tillsatt radioaktivt inmärkt ligand relateras till motsvarande nominella receptorkoncentration, och denna ska användas vid tester av mättnad och kompetitiv bindning. Ofta överensstämmer en slutlig hrER-koncentration på 0,5 nM med detta förhållande.

13. Om 20-procentskriteriet vid upprepade försök inte kan uppfyllas ska experimentets uppställning kontrolleras för möjliga fel. Svårigheter att uppnå 20-procentskriteriet kan indikera att det finns väldigt lite aktiv receptor i satsen av rekombinant receptor och man bör då överväga att använda en annan sats.

Mättnadstest

14. Åtta ökande koncentrationer av [^{3}H]-17β-östradiol ska utvärderas i tripletter, enligt följande tre betingelser (se tabell 2):

— I frånvaron av ej inmärkt 17β-östradiol och närvaro av ER. Här fastställs total bindning genom att mäta radioaktiviteten i de brunnar som enbart innehåller [^{3}H]-17β-östradiol.

— I närvaron av 1 000 gångers koncentrationsöverskott av ej inmärkt 17β-östradiol över inmärkt 17β-östradiol och närvaro av ER. Avsikten med denna betingelse är att mätta de aktiva bindningsplatserna med ej inmärkt 17β-östradiol och, genom att mäta radioaktiviteten i brunnarna, fastställa den icke-specifika bindningen. Eventuellt kvarvarande radioaktiv östradiol som kan binda till receptorn anses binda till en icke-specifik bindningsplats eftersom den tillsatta icke-radioaktiva östradiolen ska ha så hög koncentration att den har bundit till alla specifika bindningsplatser på receptorn.

— I frånvaro av ej inmärkt 17β-östradiol och frånvaro av ER (fastställande av total radioaktivitet).

Beredning av lösningar med [^{3}H]-17β-östradiol respektive ej inmärkt 17β-östradiol

15. Spädningar av [^{3}H]-17β-östradiol ska beredas genom att tillsätta testbuffert till en 12 nM stamlösning av [^{3}H]-17β-östradiol för att få koncentrationer som initialt sträcker sig från 0,12 nM till 12 nM. Genom att tillsätta 40 μl av dessa lösningar till respektive testbrunnar i en 96-hålsmikrotiterplatta (till en slutvolym på 160 μl) erhålls slutliga testkoncentrationer på 0,03–3,0 nM. Beredning av testbuffert, stamlösning med [^{3}H]-17β-östradiol samt spädningar och fastställande av koncentrationer beskrivs i detalj i FW-protokollet (2).

16. Spädningar av etanolinnehållande 17β-östradiollösningar ska beredas genom att tillsätta testbuffert och på så sätt erhålla åtta ökande koncentrationer, initialt från 0,06 μM till 6 μM. Genom att tillsätta 80 μl av dessa lösningar till respektive testbrunn i en 96-hålsmikrotiterplatta (till en slutvolym på 160 μl) erhålls slutliga testkoncentrationer på 0,03–3 μM. Slutkoncentrationen av ej inmärkt 17β-östradiol i de olika icke-specifika bindningstestbrunnarna bör vara 1 000 gånger högre än koncentrationen av [^{3}H]-17β-östradiol. Beredning av spädningar av ej inmärkt 17β-östradiol beskrivs i detalj i FW-protokollet (2).

17. Den nominella receptorkoncentration som ger specifik bindning av 20 ± 5 % bör användas (se punkterna 12–13). Lösningen med hrERα ska beredas omedelbart före användning.

18. Förbered 96-hålsmikrotiterplattorna enligt schema i tabell 2, med tre replikat per koncentration. Exempel på fördelning över plattan av koncentrationer och volymer av [^{3}H]-17β-östradiol, ej inmärkt 17β-östradiol, buffert och receptor ges i tillägg 2.2.

Tabell 2

Upplägg för mikrotiterplatta till mättnadsbindningstest

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H]E2 + ER			0,06 nM [^{3}H]E2 + ER			0,08 nM [^{3}H]E2 + ER			0,10 nM [$_3$H]E2 + ER			Total bindning (lösningsmedel)
B	0,30 nM [^{3}H]E2 + ER			0,60 nM [^{3}H]E2 + ER			1,0 nM [^{3}H]E2 + ER			3,0 nM [^{3}H]E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H]E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [^{3}H]E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [^{3}H]E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [3H]E2 + ER + 0,10 μM E2			Icke-specifik bindning
E	0,30 nM [^{3}H]E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [^{3}H]E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [^{3}H]E2 + ER + 1,0 μM E2			3,0 nM [^{3}H]E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G													
H													

[^{3}H]E2: [^{3}H]-17β-östradiol.
ER: östrogenreceptor.
E2: ej inmärkt 17β-östradiol.

19. Testmikrotiterplattor bör inkuberas på horisontellt cirkulerande skak vid 2–8 °C i 16–20 timmar.

Mätning av [^{3}H]-17β-östradiol bunden till hrERα

20. Den [^{3}H]-17β-östradiol som är bunden till hrERα ska separeras från fri [^{3}H]-17β-östradiol genom tillsats av 80 μl kall DCC-suspension till varje brunn, plattorna skakas sedan i 10 minuter och centrifugeras i 10 minuter med ungefär 2 500 varv per minut. För att minimera dissociationen av den bundna [^{3}H]-17β-östradiolen från hrERα under denna procedur är det extremt viktigt att buffertarna och testbrunnarna håller en temperatur mellan 2 och 8 °C och att varje steg utförs snabbt. En skakapparat för mikrotiterplattor är nödvändig för snabb och effektiv hantering av plattorna.

21. Sedan tas 50 μl supernatant innehållande den hrERα-bundna [^{3}H]-17β-östradiolen, men extremt försiktigt så att man inte råkar förorena brunnarna genom att vidröra DCC, och placeras i en andra mikrotiterplatta.

22. Sedan tillsätts 200 μl scintillationsvätska, som kan omvandla den nukleära strålningens rörelseenergi till ljus, till varje brunn (A1–B12 och D1–E12). Brunnarna G1–H12 (kvantifieras i totala dpm) utgör en seriespädning av [^{3}H]-17β-östradiol (40 μl) som ska överföras direkt till scintillationsvätskan i mätplattans brunnar enligt tabell 3, dvs. dessa brunnar innehåller endast 200 μl scintillationsvätska och korrekt spädning av [^{3}H]-17β-östradiol. Dessa mätningar visar, i dpm, hur mycket [^{3}H]-17β-östradiol som tillsattes till varje uppsättning brunnar för total bindning och icke-specifik bindning.

Tabell 3

Upplägg av mikrotiterplatta vid mättnadsbindningstest, mätning av radioaktivitet

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H]E2 + ER			0,06 nM [^{3}H]E2 + ER			0,08 nM [^{3}H]E2 + ER			0,10 nM [$_3$H]E2 + ER			Total bindning (lösningsmedel)
B	0,30 nM [^{3}H]E2 + ER			0,60 nM [^{3}H]E2 + ER			1,0 nM [^{3}H]E2 + ER			3,0 nM [^{3}H]E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H]E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [^{3}H]E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [^{3}H]E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [3H]E2 + ER + 0,10 μM E2			Icke-specifik bindning
E	0,30 nM [^{3}H]E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [^{3}H]E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [^{3}H]E2 + ER + 1,0 μM E2			3,0 nM [^{3}H]E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G	0,03 nM [3H] E2 (totala dpm)			0,06 nM [3H] E2			0,08 nM [3H] E2			0,10 nM [3H] E2			Totala dpm (*)
H	0,30 nM [^{3}H]E2			0,60 nM [^{3}H]E2			1,0 nM [^{3}H]E2			3,0 nM [^{3}H]E2			

[^{3}H]E2: [3H]-17β-östradiol.
ER: östrogenreceptor.
E2: ej inmärkt 17β-östradiol.
dpm: sönderfall per minut (disintegrations per minute).
(*) Seriespädningarna av [^{3}H]-inmärkt östradiol bör tillsättas direkt till 200 μl scintillationsvätska i brunnar G1–H12.

23. Mätningarna ska starta med en fördröjning om minst 2 timmar och varje brunn ska mätas i 40 minuter. En scintillationsräknare för mikrotiterplattor bör användas för att fastställa dpm/brunn med korrigering för quenching. Om en scintillationsräknare för mikrotiterplattor inte finns att tillgå kan proverna mätas i en traditionell räknare. Under sådan förhållanden kan man överväga en kortare mättid.

Kompetitivt bindningstest

24. Det kompetitiva bindningstestet mäter bindningen av [^{3}H]-17β-östradiol vid en viss koncentration i närvaro av ökande koncentration av testkemikalie. Tre parallella replikat bör användas för varje koncentration i varje testomgång. Dessutom bör tre icke-parallella testomgångar utföras för varje testad kemikalie. Testet bör utföras i en eller flera 96-hålsmikrotiterplattor.

Kontroller

25. Varje experiment ska inkludera parallella lösningsmedelprover och kontroller (dvs. referensöstrogen, svag bindare och icke-bindare). Fullständiga koncentrationskurvor för östrogenreferens och kontroller (dvs. svag bindare resp. icke-bindare) ska placeras i en platta vid varje testomgång. Alla andra plattor ska innehålla: i) en hög (maximal bortträngning) respektive medelhög (ungefär IC_{50}) koncentration av E2 respektive svag bindare i tripletter, ii) lösningsmedelskontroll och icke-specifik bindning, båda som tripletter. Förfaranden för beredning av testbuffert, kontroller [^{3}H]-17β-östradiol, hrERα och testkemikalielösningar beskrivs i referens 2 (bilaga K, se FW Assay Protocol).

Lösningsmedelskontroll

26. Lösningsmedelskontrollen indikerar att lösningsmedlet inte interagerar med testsystemet och mäter också total bindning (TB). Etanol är det mest lämpliga lösningsmedlet. Men om testkemikaliens högsta koncentration inte är löslig i etanol kan DMSO användas. Koncentrationen av etanol, eller DMSO om det används, blir 1,5 % i det slutliga testbrunnarna och får inte överstiga 2 %.

Buffertkontroll

27. Buffertkontrollen (BC) ska inte innehålla vare sig lösningsmedel eller testkemikalie men testets alla övriga ingående delar. Resultaten för buffertkontrollen jämförs med lösningsmedelskontrollen för att säkerställa att det valda lösningsmedlet inte påverkar testsystemet.

Stark bindare (referensöstrogen)

28. Den endogena liganden är 17β-östradiol (CAS-nr 50-28-2) och den binder med hög affinitet till alfa-subtypen av ER. En standardkurva med ej inmärkt 17β-östradiol ska upprättas för varje kompetitivt hrERα-bindningstest, för att möjliggöra en bedömning av variationen när testet, över tid, upprepas i samma laboratorium. Åtta lösningar av ej inmärkt 17β-östradiol ska beredas i etanol, med koncentrationer i testbrunnarna som sträcker sig från 100 nM–10 pM (–7[logM] till –11[logM]), med följande spridning (–7[logM], –8[logM], –8,5[logM], –9[logM], –9,5[logM], –10[logM], –11[logM]). Den högsta koncentrationen av ej inmärkt 17β-östradiol (1 μM) indikerar också icke-specifik bindning. Denna koncentration markeras med märkningen ”NSB” i tabell 4 även om den också är en del av standardkurvan.

Svag bindare

29. En svag bindare (noretynodrel [CAS-nr 68-23-5] eller noretindron [CAS-nr 68-22-4]) bör inkluderas för att påvisa varje experiments känslighet och möjliggöra en bedömning av variation när testet används längre perioder. Åtta lösningar av den svaga bindaren ska beredas i etanol, med koncentrationer i testbrunnarna som sträcker sig från 3 nM till 30 μM (–8,5[logM] till –4,5logM]), med följande spridning: –4,5[logM], –5[logM], –5,5[logM], –6[logM], –6,5[logM], –7[logM], –7,5[logM], –8,5[logM].

Icke-bindare

30. Oktyltrietoxisilan (OTES, CAS-nr 2943-75-1) ska användas som negativ kontroll (icke-bindare). Den ger återkoppling om att testet, så som det utförs, detekterar när testkemikalier inte binder till hrERα. Åtta lösningar av icke-bindaren ska beredas i etanol, med koncentrationer som i testbrunnarna sträcker sig, i tiopotenssteg, från 0,1 nM–1 000 μM (–10[logM] till –3[logM]). Di-*n*-butylftalat (DBP) kan användas som en alternativ icke-bindare-kontroll. Dess maximala löslighet har visats vara –4[logM].

hrERα-koncentration

31. Den mängd receptor som ger en specifik bindning på 20 ± 5 % av 1 nM radioaktivt märkt ligand bör användas (se punkterna 12–13 i tillägg 2). Lösningen med hrERα ska beredas omedelbart före användning.

[3H]-17β-östradiol.

32. Koncentrationen för [^{3}H]-17β-östradiol i testbrunnarna bör vara 1,0 nM.

Testkemikalier

33. Vid det första tillfället är det nödvändigt att genomföra ett löslighetstest för att fastställa löslighetsgränsen för varje testkemikalie och för att identifiera lämpligt koncentrationsintervall att använda sig av under testet. Samtliga testkemikaliers respektive löslighetsgräns i lösningsmedlet ska fastställas initialt och vidare bekräftas under testbetingelser. Den slutkoncentration som används i testet ska inte överstiga 1 mM. Intervallsökningen görs med en lösningsmedelskontroll och åtta logaritmiska seriespädningar, där man börjar med maximal acceptabel koncentration (t.ex. 1 mM eller lägre, baserat på löslighetsgräns), och närvaron av grumlighet eller fällning (se också punkt 35). Testkemikalien ska testas med 8 koncentrationskurvor med logaritmisk spridning utifrån fynden i det föregående intervallsökningstestet. Koncentrationer i det andra och tredje experimenten bör anpassas för en bättre karakterisering av koncentration–responskurvan.

34. Spädningar av testkemikalien ska beredas i lämpligt lösningsmedel (se punkt 26 i tillägg 2). Om testkemikaliens högsta koncentration inte är löslig i vare sig etanol eller DMSO, och en tillsats av mer lösningsmedel skulle göra att koncentrationen av lösningsmedel i det slutliga provröret överskred den godtagbara gränsen, kan den högsta koncentrationen sänkas till nästa lägre koncentration. I sådana fall kan ytterligare en koncentration läggas till i den lägre änden av koncentrationsserien. Övriga koncentrationer i serien bör förbli oförändrade.

35. Testkemikalielösningarna ska iakttas noggrant vid tillsatsen till testbrunnen, eftersom testkemikalien kan fälla ut i detta steg. Data för alla brunnar som innehåller en fällning ska uteslutas från kurvanpassning och anledningen till uteslutningen av data noteras.

36. Om det sedan tidigare från andra källor finns information som tillhandahåller ett log(IC_{50})-värde för en testkemikalie, kan det vara lämpligt att geometriskt sprida spädningarna (dvs. 0,5 log-enheter runt det förväntade log[IC_{50}]-värdet). Slutresultatet bör återspegla tillräcklig spridning av koncentrationer på båda sidor av log(IC_{50})-värdet, inklusive ”topp” och ”botten”, så att bindningskurvan kan karakteriseras tillfredsställande.

Organisering av testplattor

37. Märkta mikrotiterplattor ska beredas för sexfaldiga inkubationer med koder för lösningsmedelskontrollen, den högsta koncentrationen av referensöstrogen som också tjänar som indikator på icke-specifik bindning (NSB), och buffertkontrollen, samt för inkubation i tripletter med koder för var och en av de åtta koncentrationerna för icke-bindande kontroll (oktyltrietoxisilan), de sju lägre koncentrationerna av referensöstrogen, de åtta koncentrationsnivåerna för svag bindare och de åtta koncentrationerna av varje testkemikalie (TC). Ett exempel på upplägget av plattschemat för fullständiga koncentrationskurvor för referensöstrogen och kontroll ges nedan i tabell 4. Ytterligare mikrotiterplattor används för testkemikalierna och ska inkludera plattkontroller, dvs. 1) en hög koncentration (maximal bortträngning) och en mellankoncentration (ungefär IC_{50}) av vardera E2 och svag bindare i tripletter, 2) lösningsmedelskontroll och icke-specifik bindning, båda sexfalt (tabell 5). Ett exempel på plattupplägg för ett kompetitivt test med tre okända testkemikalier ges i tillägg 2.3. De koncentrationer som anges i tabellerna 4 och 5 är testets slutkoncentrationer. Maximal koncentration för E2 ska vara 1×10^{-7} M och för den svaga bindaren bör den högsta koncentrationen som används för den svaga bindaren på platta 1 användas. Laboratoriet ska fastställa IC_{50} med hjälp av sin historiska kontrolldatabas. Detta värde kan förväntas vara jämförbart med det som iakttagits i valideringsstudierna (se tabell 1).

Tabell 4

Upplägg för mikrotiterplatta till kompetitivt bindningstest, fullständiga koncentrationskurvor för referensöstrogen och kontroller (platta 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (endast lösningsmedel)			TB (endast lösningsmedel)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1 \times 10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Blankprov (*)		
D	NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1 \times 10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1 \times 10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1 \times 10^{-7,5}$)			NE ($1 \times 10^{-8,5}$)		
F	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
G	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Blankprov (radioaktivitet) (**)			Blankprov (radioaktivitet) (**)			Buffertkontroll			Buffertkontroll		

I detta exempel är den svaga bindaren noretinodrel (NE).
(*) Faktiskt blankprov, brunnen används inte.
(**) Blankprov ej använt under inkubationen, men till för att bekräfta total tillsatt mängd radioaktivitet.

Tabell 5

Upplägg för mikrotiterplatta till kompetitivt bindningstest, fullständiga koncentrationskurvor för testkemikalier och plattkontroller

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (endast lösningsmedel)			TB (endast lösningsmedel)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
C	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
D	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
E	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
F	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
G	TC3 (1×10^{-7})			TC3 (1×10^{-8})			TC3 (1×10^{-9})			TC3 (1×10^{-10})		
H	NE (IC_{50})			NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10^{-7})		

I detta exempel är den svaga bindaren noretinodrel (NE).

Slutförande av kompetitivt bindningstest

38. Som visas i tabell 6, ska 80 µl av lösningsmedelskontrollen, buffertkontrollen, östrogenreferensen, den svaga bindaren, icke-bindaren och testkemikalierna som har beretts i testbuffert tillsättas till brunnarna. Sedan ska 40 µl av en 4 nM [^{3}H]-17β-östradiollösning tillsättas till varje brunn. Efter mild rotation i 10–15 minuter vid 2–8 °C, ska 40 µl hrERα-lösning tillsättas. Testmikrotiterplattor bör inkuberas på roterande skak vid 2–8 °C i 16–20 timmar.

Tabell 6

Tillsatsvolymer av beståndsdelar till kompetitivt bindningstest för hrER, i mikrotiterplattor

Volym (µl)	Beståndsdel
80	Ej inmärkt 17β-östradiol, noretynodrel, OTES, testkemikalier, lösningsmedel eller buffert
40	4 nM [^{3}H]-17β-östradiollösning
40	hrERα-lösning, enligt fastställd koncentration
160	***Total volym i varje testbrunn***

39. Kvantifieringen av [^{3}H]-17β-östradiol bundet till hrERα, efter separation av [^{3}H]-17β-östradiol bundet till hrERα från fritt [^{3}H]-17β-östradiol genom tillsats av 80 µl av kall DCC-suspension till varje brunn, bör sedan utföras enligt instruktioner för mättnadsbindningstestet, i punkterna 20–23.

40. Brunnarna H1–6 (identifierade som blankprov [radioaktivitet] i tabell 4) anger dpm för [^{3}H]-inmärkt östradiol i 40 µl. Dosen om 40 µl bör överföras direkt till scintillationsvätskan i brunnarna H1–H6.

Acceptanskriterier

Mättnadsbindningstest

41. Den specifika bindningskurvan bör nå en platå med ökande koncentrationer av [^{3}H]-17β-östradiol, indikerande mättnad av hrERα med ligand.

42. Den specifika bindningen vid 1 nM av [^{3}H]-17β-östradiol bör vara inom acceptansintervallet 15–25 % för genomsnittet av uppmätt total tillsatt radioaktivitet från de olika testomgångarna. Enstaka mindre avvikelser utanför detta intervall kan godtas, men om testomgångar konsekvent faller utanför intervallet eller om en viss omgång signifikant faller utanför intervallet bör proteinkoncentrationen justeras och mättnadstestet upprepas.

43. Data bör bilda ett linjärt Scatchard-diagram.

44. Den icke-specifika bindningen bör inte vara överdrivet stor. Storleken på den icke-specifika bindningen bör normalt vara < 35 % av den totala bindningen. Men kvoten kan emellanåt överskrida denna gräns vid mätningar av mycket låga dpm-tal för den lägsta koncentrationen av testad radioaktivt inmärkt 17β-östradiol.

Kompetitivt bindningstest

45. Ökande koncentrationer av ej inmärkt 17β-östradiol bör tränga bort [^{3}H]-17β-östradiol från receptorn på ett sätt som överensstämmer med kompetitiv bindning till en bindningsplats.

46. Den hämmande koncentrationen, IC_{50}, för referensöstrogenet (dvs. 17β-östradiol) bör ungefär motsvara den molära koncentrationen för [^{3}H]-17β-östradiol plus Kd-värdet, som fastställts vid mättnadsbindningstestet.

47. Den totala specifika bindningen bör genomgående hamna inom acceptansintervallet på 20 ± 5 % när den genomsnittliga uppmätta totala radioaktiva koncentrationen, som har tillsatts till varje brunn, har varit 1 nM vid flera testomgångar. Enstaka mindre avvikelser utanför detta intervall kan godtas, men om testomgångar konsekvent faller utanför intervallet eller om en viss omgång signifikant hamnar utanför intervallet bör proteinkoncentrationen justeras.

48. Lösningsmedlet bör inte påverka vare sig testets känslighet eller reproducerbarhet. Resultaten för lösningsmedelskontrollen (TB-brunnar) jämförs med buffertkontrollen för att säkerställa att det valda lösningsmedlet inte påverkar testsystemet. Om lösningsmedlet inte har någon effekt på testet bör resultaten för TB och buffertkontroll vara jämförbara.

49. Icke-bindaren bör inte tränga bort mer än 25 % av [^{3}H]-17β-östradiol från hrERα när den testas upp till 10^{-3} M (OTES) eller 10^{-4} M (DBP).

50. Prestandakriterier utarbetades för referensöstrogenet och två svaga bindare (t.ex. noretynodrel, noretindron) med hjälp av data från valideringsstudien av FW-hrER-bindningstestet (bilaga N till referens 2). I valideringsstudien uppges 95-procentiga konfidensintervall för genomsnittet (n) ± SD för deltagande laboratoriers alla kontrollomgångar. De 95-procentiga konfidensintervallen beräknades för kurvanpassningsparametrarna (dvs. topp, botten, Hill-koefficient [Hill slope], log[IC_{50}]-värde) för referensöstrogenet och de svaga bindarna, och för $\log_{10}$RBA-värdet för de svaga bindarna jämförda med referensöstrogenet, och anges som prestandakriterier för de positiva kontrollerna. Tabell 1 anger förväntade intervall för kurvanpassningsparametrarna, vilka kan användas som prestandakriterier. I praktiken kan intervallet för IC_{50} variera något med Kd för receptorberedningen och ligandkoncentrationen.

51. Inga prestandakriterier för testkemikaliernas kurvanpassningsparametrar utarbetades på grund av den stora mängden möjliga testkemikalier och deras variation i möjliga affiniteter och utfall (t.ex. fullständig kurva, delkurva, ingen kurvanpassning). Men yrkesmässigt omdöme ska tillämpas vid granskning av resultaten från en testkemikalies alla testomgångar. Vidare ska man använda ett tillräckligt intervall av testkemikaliekoncentration för att klart kunna beskriva toppen (t.ex. 90–100 % bindning) på den kompetitiva bindningskurvan. Variationen mellan replikat vid varje koncentration av testkemikalie, liksom mellan de tre oberoende testomgångarna, ska vara rimlig och vetenskapligt försvarbar. Kontroller från en testkemikalies alla testomgångar bör hålla sig nära de prestandamätningar som har rapporterats för detta FW-test och överensstämma med historiska kontrolldata från respektive laboratorium.

DATAANALYS

Mättnadsbindningstest

52. Både total och icke-specifik bindning mäts. Från dessa värden beräknas specifik bindning av ökande koncentrationer av [^{3}H]-17β-östradiol under jämviktsförhållanden genom att subtrahera icke-specifik från total. Ett diagram över specifik bindning mot [^{3}H]-17β-östradiol-koncentration bör nå en platå för maximal specifik bindning, vilken indikerar ett hrERα mättat av [^{3}H]-17β-östradiol. Dessutom bör dataanalysen klargöra inbindning av [^{3}H]-17β-östradiol till en enda bindningsplats med hög affinitet. Icke-specifik, total och specifik bindning bör illustreras med en mättnadsbindningskurva. Vidare analys av dessa data bör använda sig av icke-linjär regressionsanalys (t.ex. BioSoft, McPherson, 1985, Motulsky, 1995) med en slutlig dataredovisning i form av ett Scatchard-diagram.

53. Dataanalysen bör fastställa Bmax och Kd enbart utifrån totala bindningsdata, med antagandet att den icke-specifika bindningen är linjär, om inte en motivering ges för att använda en annan metod. Dessutom ska robust regression användas i fastställande av bästa anpassning, om inte annat val motiveras. Val av robust regressionsmetod ska anges. Korrigering för liganduttömning (t.ex. med hjälp av Swillens metod 1995) bör alltid användas i fastställande av Bmax och Kd utifrån mättnadsbindningsdata.

Kompetitivt bindningstest

54. Kurvan över kompetitiv bindning ritas som specifik [^{3}H]-17β-östradiol-bindning mot koncentrationen av konkurrerande ligand (log10-enheter). Den koncentration av testkemikalie som hämmar 50 % av den maximala specifika [^{3}H]-17β-östradiol-bindningen är IC_{50}-värdet.

55. Uppskattningar av log(IC_{50})-värden för de positiva kontrollerna (t.ex. referensöstrogen och svag bindare) ska fastställas med hjälp av lämplig programvara för icke-linjär kurvanpassning så att de passar en fyraparameters Hill-ekvation (t.ex. BioSoft, McPherson, 1985, Motulsky, 1995). Kurvans topp, botten, lutning och log(IC_{50})-värde ska i allmänhet lämnas utan restriktion (unconstrained) vid anpassning av dessa kurvor. Robust regression ska användas i fastställande av bästa anpassning, om inte annat val motiveras. Ingen korrigering för liganduttömning ska göras. Efter inledande analys ska varje bindningskurva granskas för att säkerställa korrekt anpassning till modellen. Den svaga bindarens relativa bindningsaffinitet (RBA) beräknas som procentuell andel av dess log(IC_{50})-värde i förhållande till 17β-östradiols log(IC_{50})-värde. Resultat från de positiva kontrollerna och den icke-bindande kontrollen ska utvärderas genom att använda måtten på testprestanda i punkterna 45–50 i detta tillägg 2.

56. Data för alla testkemikalier ska analyseras med en stegvis strategi för att säkerställa att data analyseras korrekt och att varje kurva för kompetitiv bindning klassificeras korrekt. Det är lämpligt att en testkemikalies alla testomgångar initialt underkastas en standardiserad dataanalys som är identisk med den som använts för referensöstrogen och kontroller med svaga bindare (se punkt 55 ovan). När den är klar bör en teknisk granskning av kurvanpassningsparametrarna göras, liksom en visuell granskning av hur väl data stämmer med den genererade kurvan över kompetitiv bindning, för varje testomgång. Under denna tekniska granskning är följande iakttagelser goda indikationer på att testet och dataanalyserna genomförts korrekt: en koncentrationsberoende minskning i procentuell, specifikt bunden [^{3}H]-17β-östradiol, låg variation mellan de tekniska replikaten för varje kemisk koncentration och överensstämmelse mellan anpassningsparametrarna från de tre testomgångarna.

Tolkning av data

57. Förutsatt att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses en testkemikalie binda till hrERα om data kan anpassas till en bindningskurva och den lägsta punkten på responskurvan, inom dataintervallet, är mindre än 50 % (figur 1).
58. Förutsatt att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda, anses en testkemikalie inte binda till hrERα om
    — data kan anpassas till en bindningskurva och den lägsta punkten på responskurvan, inom dataintervallet, är över 75 %, eller
    — data inte kan anpassas till en bindningskurva och den lägsta, outjämnade genomsnittliga procentuella bindningen inom datamängdens koncentrationsgrupper är över 75 %.
59. Testkemikalier anses tvetydiga om inget av villkoren ovan uppfylls (t.ex. den lägsta punkten på den anpassade responskurvan ligger mellan 76 % och 51 %).

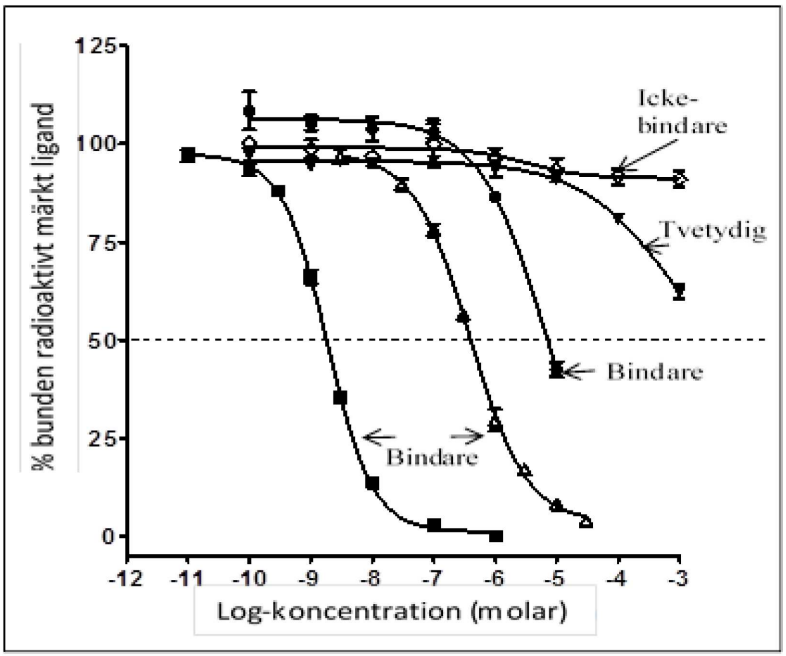
Tabell 7

Kriterier för klassificering utifrån en testkemikalies kurva över kompetitiv bindning

Klassificering	Kriterier
Bindare[a]	Data kan anpassas till en bindningskurva. Den **lägsta punkten på responskurvan, inom dataintervallet, är mindre än 50 %.**
Icke-bindare[b]	Om data kan anpassas till en bindningskurva och den **lägsta punkten på den anpassade responskurvan, inom dataintervallet, är över 75 %.** Om data inte kan anpassas till en bindningskurva och den **lägsta, outjämnade genomsnittliga procentuella bindningen inom datamängdens koncentrationsgrupper är över 75 %.**
Tvetydig[c]	Varje mätbar testomgång som varken är en bindare eller en icke-bindare (t.ex. den lägsta punkten längs den anpassade kurvan ligger mellan 76–51 %).

Figur 1

Exempel på klassificeringar av testkemikalier med hjälp av kurva för kompetitiv bindning



60. Flera testomgångar genomförda med en viss testkemikalie, i samma laboratorium, kombineras genom att tilldela numeriska värden till varje omgång och ta fram ett medelvärde enligt tabell 8. Resultaten för de kombinerade testomgångarna inom varje laboratorium jämförs med den förväntade klassificeringen för varje testkemikalie.

Tabell 8

Metod för klassificering av testkemikalier med användning av flera testomgångar inom ett laboratorium

Tilldelning av numeriska värden för enskilda testomgångar:	
Klassificering	**Numeriskt värde**
Bindare	2
Tvetydig	1
Icke-bindare	0
Klassificering av genomsnittligt numeriskt värde vid flera testomgångar:	
Klassificering	**Numeriskt värde**
Bindare	Genomsnitt ≥ 1,5
Tvetydig	0,5 ≤ genomsnitt < 1,5
Icke-bindare	Genomsnitt < 0,5

TESTRAPPORT

61. Se punkt 24 i ”h**rER-BINDNINGSTESTETS DELAR**” i denna testmetod.

Tillägg 2.1

TERMER

[^{3}H]E2: 17β-östradiol radioaktivt inmärkt med tritium.

DCC: Dextran-täckt träkol (Dextran-Coated Charcoal).

E2: Ej inmärkt 17β-östradiol (inert).

Testbuffert: 10 mM tris, 10 mg/ml bovint serumalbumin, 2 mM DTT, 10 % glycerol, 0,2 mM leupeptin, pH 7,5.

hrERα: Human rekombinant östrogenreceptor alfa.

Replikat: En av flera brunnar med samma innehåll och koncentrationer vilka testas parallellt inom en enskild testomgång. I detta protokoll testas varje koncentration av testkemikalie i tripletter, det betyder att tre replikat testas samtidigt vid varje koncentration av testkemikalie.

Testomgång: En fullständig uppsättning av parallellt hanterade brunnar i mikrotiterplattor, vilka ger all nödvändig information för att karakterisera en testkemikalies bindning till hrERα (dvs. totalt [^{3}H]-17β-östradiol tillsatt till testbrunnen, maximal bindning hos [^{3}H]-17β-östradiol till hrERα, icke-specifik bindning och total bindning vid olika koncentrationer av testkemikalie). En testomgång kan bestå av så lite som en testbrunn (dvs. ett replikat) per koncentration, men eftersom protokollet kräver tripletter, består en testomgång av tre testbrunnar per koncentration. Dessutom kräver detta protokoll tre oberoende (dvs. icke-parallella) testomgångar per kemikalie.

Tillägg 2.2

REPRESENTATIVT [^{3}H]-17B-ÖSTRADIOL-MÄTTNADSTEST MED REPLIKAT I TRE BRUNNAR

Representativt [^{3}H]-17β-östradiol-mättnadstest med replikat i tre brunnar											
Position	**Replikat**	**Kod för brunnstyp**	**Initial radioaktiv E2-koncentration (nM)**	**Radioaktiv E2-volym (µl)**	**Slutlig radioaktiv E2-koncentration (nM)**	**Initial icke-radioaktiv E2-koncentration (µM)**	**Icke-radioaktiv E2-volym (µl)**	**Slutlig icke-radioaktiv E2-koncentration (µM)**	**Buffertvolym (µl)**	**Receptorvolym (µl)**	**Total volym i brunnarna (µl)**
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

Representativt [^{3}H]-17β-östradiol-mättnadstest med replikat i tre brunnar											
Position	**Replikat**	**Kod för brunnstyp**	**Initial radioaktiv E2-koncentration (nM)**	**Radioaktiv E2-volym (µl)**	**Slutlig radioaktiv E2-koncentration (nM)**	**Initial icke-radioaktiv E2-koncentration (µM)**	**Icke-radioaktiv E2-volym (µl)**	**Slutlig icke-radioaktiv E2-koncentration (µM)**	**Buffertvolym (µl)**	**Receptorvolym (µl)**	**Total volym i brunnarna (µl)**
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

Representativt [^{3}H]-17β-östradiol-mättnadstest med replikat i tre brunnar											
Position	**Replikat**	**Kod för brunnstyp**	**Initial radioaktiv E2-koncentration (nM)**	**Radioaktiv E2-volym (µl)**	**Slutlig radioaktiv E2-koncentration (nM)**	**Initial icke-radioaktiv E2-koncentration (µM)**	**Icke-radioaktiv E2-volym (µl)**	**Slutlig icke-radioaktiv E2-koncentration (µM)**	**Buffertvolym (µl)**	**Receptorvolym (µl)**	**Total volym i brunnarna (µl)**
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Radio-aktiv	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Radio-aktiv	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Radio-aktiv	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Radio-aktiv	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Radio-aktiv	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Radio-aktiv	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Radio-aktiv	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Radio-aktiv	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Radio-aktiv	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Radio-aktiv	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Radio-aktiv	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Radio-aktiv	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Radio-aktiv	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Radio-aktiv	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Radio-aktiv	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Radio-aktiv	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40

Representativt [^{3}H]-17β-östradiol-mättnadstest med replikat i tre brunnar

Position	Replikat	Kod för brunnstyp	Initial radioaktiv E2-koncentration (nM)	Radioaktiv E2-volym (µl)	Slutlig radioaktiv E2-koncentration (nM)	Initial icke-radioaktiv E2-koncentration (µM)	Icke-radioaktiv E2-volym (µl)	Slutlig icke-radioaktiv E2-koncentration (µM)	Buffertvolym (µl)	Receptorvolym (µl)	Total volym i brunnarna (µl)
H5	2	Radio-aktiv	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Radio-aktiv	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Radio-aktiv	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Radio-aktiv	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Radio-aktiv	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Radio-aktiv	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Radio-aktiv	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Radio-aktiv	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Obs: brunnarna som märkts med ”radioaktiv” är tomma under inkubationen. Dessa 40 µl tillsätts endast i scintillationsräkningssyfte.

Tillägg 2.3

UPPLÄGG FÖR BRUNNAR TILL TEST AV KOMPETITIV BINDNING

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
Fast	A1	1	Total bindning	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
Fast	A2	2	Total bindning	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
Fast	A3	3	Total bindning	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
Fast	A4	1	Total bindning	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
Fast	A5	2	Total bindning	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
Fast	A6	3	Total bindning	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
Fast	A7	1	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S0	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	A8	2	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S0	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	A9	3	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S0	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	A10	1	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S0	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	A11	2	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S0	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	A12	3	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S0	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	B1	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S1	$2{,}00 \times 10^{-7}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-7}$
Fast	B2	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S1	$2{,}00 \times 10^{-7}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-7}$
Fast	B3	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S1	$2{,}00 \times 10^{-7}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-7}$
Fast	B4	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S2	$2{,}00 \times 10^{-8}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-8}$
Fast	B5	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S2	$2{,}00 \times 10^{-8}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-8}$
Fast	B6	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S2	$2{,}00 \times 10^{-8}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-8}$
Fast	B7	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S3	$6{,}00 \times 10^{-9}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-9}$
Fast	B8	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S3	$6{,}00 \times 10^{-9}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-9}$
Fast	B9	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S3	$6{,}00 \times 10^{-9}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-9}$

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
Fast	B10	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S4	$2{,}00 \times 10^{-9}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-9}$
Fast	B11	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S4	$2{,}00 \times 10^{-9}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-9}$
Fast	B12	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S4	$2{,}00 \times 10^{-9}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-9}$
Fast	C1	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S5	$6{,}00 \times 10^{-10}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-10}$
Fast	C2	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S5	$6{,}00 \times 10^{-10}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-10}$
Fast	C3	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S5	$6{,}00 \times 10^{-10}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-10}$
Fast	C4	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S6	$2{,}00 \times 10^{-10}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-10}$
Fast	C5	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S6	$2{,}00 \times 10^{-10}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-10}$
Fast	C6	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S6	$2{,}00 \times 10^{-10}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-10}$
Fast	C7	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S7	$2{,}00 \times 10^{-11}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-11}$
Fast	C8	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S7	$2{,}00 \times 10^{-11}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-11}$
Fast	C9	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S7	$2{,}00 \times 10^{-11}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-11}$
Fast	C10	1	Blankprov	Blan-kpro-v	B1	—	—	160	—	—	160	—
Fast	C11	2	Blankprov	Blan-kprov	B2	—	—	160	—	—	160	—
Fast	C12	3	Blankprov	Blan-kpro-v	B3	—	—	160	—	—	160	—
Fast	D1	1	Noretynodrel	NE	WP1	$6{,}00 \times 10^{-5}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-5}$
Fast	D2	1	Noretynodrel	NE	WP1	$6{,}00 \times 10^{-5}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-5}$
Fast	D3	1	Noretynodrel	NE	WP1	$6{,}00 \times 10^{-5}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-5}$
Fast	D4	1	Noretynodrel	NE	WP2	$2{,}00 \times 10^{-5}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-5}$
Fast	D5	1	Noretynodrel	NE	WP2	$2{,}00 \times 10^{-5}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-5}$
Fast	D6	1	Noretynodrel	NE	WP2	$2{,}00 \times 10^{-5}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-5}$

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
Fast	D7	1	Noretynodrel	NE	WP3	$6{,}00 \times 10^{-6}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	D8	1	Noretynodrel	NE	WP3	$6{,}00 \times 10^{-6}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	D9	1	Noretynodrel	NE	WP3	$6{,}00 \times 10^{-6}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	D10	1	Noretynodrel	NE	WP4	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	D11	1	Noretynodrel	NE	WP4	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	D12	1	Noretynodrel	NE	WP4	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	E1	1	Noretynodrel	NE	WP	$6{,}00 \times 10^{-7}$	40		40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-7}$
Fast	E2	2	Noretynodrel	NE	WP	$6{,}00 \times 10^{-7}$	40		40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-7}$
Fast	E3	3	Noretynodrel	NE	WP	$6{,}00 \times 10^{-7}$	40		40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-7}$
Fast	E4	1	Noretynodrel	NE	WP	$2{,}00 \times 10^{-7}$	40		40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-7}$
Fast	E5	2	Noretynodrel	NE	WP	$2{,}00 \times 10^{-7}$	40		40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-7}$
Fast	E6	3	Noretynodrel	NE	WP	$2{,}00 \times 10^{-7}$	40		40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-7}$
Fast	E7	1	Noretynodrel	NE	WP	$6{,}00 \times 10^{-8}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-8}$
Fast	E8	2	Noretynodrel	NE	WP	$6{,}00 \times 10^{-8}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-8}$
Fast	E9	3	Noretynodrel	NE	WP	$6{,}00 \times 10^{-8}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-8}$
Fast	E10	1	Noretynodrel	NE	WP	$6{,}00 \times 10^{-9}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-9}$

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
Fast	E11	2	Noretynodrel	NE	WP	$6{,}00 \times 10^{-9}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-9}$
Fast	E12	3	Noretynodrel	NE	WP	$6{,}00 \times 10^{-9}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-9}$
Fast	F1	1	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-3}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-3}$
Fast	F2	2	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-3}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-3}$
Fast	F3	3	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-3}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-3}$
Fast	F4	1	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-4}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-4}$
Fast	F5	2	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-4}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-4}$
Fast	F6	3	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-4}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-4}$
Fast	F7	1	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-5}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-5}$
Fast	F8	2	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-5}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-5}$
Fast	F9	3	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-5}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-5}$
Fast	F10	1	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	F11	2	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	F12	3	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	G1	1	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-7}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-7}$
Fast	G2	2	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-7}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-7}$
Fast	G3	3	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-7}$	40	—	40	80	160	$3{,}0 \times 10^{-7}$
Fast	G4	1	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-8}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-8}$
Fast	G5	2	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-8}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-8}$
Fast	G6	3	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-8}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-8}$
Fast	G7	1	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-9}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-9}$

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
Fast	G8	2	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-9}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-9}$
Fast	G9	3	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-9}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-9}$
Fast	G10	1	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-10}$	40	—	40	—	160	$1{,}0 \times 10^{-10}$
Fast	G11	2	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-10}$	40	—	40	—	160	$1{,}0 \times 10^{-10}$
Fast	G12	3	OTES	N	OTES	$2{,}00 \times 10^{-10}$	40	—	40	—	160	$1{,}0 \times 10^{-10}$
Fast	H1	1	Radioaktiv	H	H	—	—	—	40	—	40	—
Fast	H2	1	Radioaktiv	H	H	—	—	—	40	—	40	—
Fast	H3	1	Radioaktiv	H	H	—	—	—	40	—	40	—
Fast	H4	1	Radioaktiv	H	H	—	—	—	40	—	40	—
Fast	H5	1	Radioaktiv	H	H	—	—	—	40	—	40	—
Fast	H6	1	Radioaktiv	H	H	—	—	—	40	—	40	—
Fast	H7	1	Buffertkontroll	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
Fast	H8	1	Buffertkontroll	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
Fast	H9	1	Buffertkontroll	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
Fast	H10	1	Buffertkontroll	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
Fast	H11	1	Buffertkontroll	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
Fast	H12	1	Buffertkontroll	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—

Obs: brunnarna som märkts med ”radioaktiv” är tomma under inkubationen. Dessa 40 µl tillsätts endast i scintillationsräkningssyfte.

Upplägg för brunnar till test av kompetitiv bindning

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
P1	A1	1	Total bindning	TB	TBB1B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	Total bindning	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	Total bindning	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	Total bindning	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	Total bindning	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	Total bindning	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S0	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	A8	2	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S0	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	A9	3	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S0	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	A10	1	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S0	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	A11	2	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S0	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	A12	3	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S0	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	B1	1	Testkemikalie 1	TC1	1	$2{,}00 \times 10^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-3}$
P1	B2	2	Testkemikalie 1	TC1	1	$2{,}00 \times 10^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-3}$
P1	B3	3	Testkemikalie 1	TC1	1	$2{,}00 \times 10^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-3}$
P1	B4	1	Testkemikalie 1	TC1	2	$2{,}00 \times 10^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-4}$
P1	B5	2	Testkemikalie 1	TC1	2	$2{,}00 \times 10^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-4}$
P1	B6	3	Testkemikalie 1	TC1	2	$2{,}00 \times 10^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-4}$
P1	B7	1	Testkemikalie 1	TC1	3	$2{,}00 \times 10^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-5}$
P1	B8	2	Testkemikalie 1	TC1	3	$2{,}00 \times 10^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-5}$
P1	B9	3	Testkemikalie 1	TC1	3	$2{,}00 \times 10^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-5}$
P1	B10	1	Testkemikalie 1	TC1	4	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	B11	2	Testkemikalie 1	TC1	4	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	B12	3	Testkemikalie 1	TC1	4	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$

Upplägg för brunnar till test av kompetitiv bindning

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
P1	C1	1	Testkemikalie 1	TC1	5	$2{,}00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-7}$
P1	C2	2	Testkemikalie 1	TC1	5	$2{,}00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-7}$
P1	C3	3	Testkemikalie 1	TC1	5	$2{,}00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-7}$
P1	C4	1	Testkemikalie 1	TC1	6	$2{,}00 \times 10^{-8}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-8}$
P1	C5	2	Testkemikalie 1	TC1	6	$2{,}00 \times 10^{-8}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-8}$
P1	C6	3	Testkemikalie 1	TC1	6	$2{,}00 \times 10^{-8}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-8}$
P1	C7	1	Testkemikalie 1	TC1	7	$2{,}00 \times 10^{-9}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-9}$
P1	C8	2	Testkemikalie 1	TC1	7	$2{,}00 \times 10^{-9}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-9}$
P1	C9	3	Testkemikalie 1	TC1	7	$2{,}00 \times 10^{-9}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-9}$
P1	C10	1	Testkemikalie 1	TC1	8	$2{,}00 \times 10^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-10}$
P1	C11	2	Testkemikalie 1	TC1	8	$2{,}00 \times 10^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-10}$
P1	C12	3	Testkemikalie 1	TC1	8	$2{,}00 \times 10^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-10}$
P1	D1	1	Testkemikalie 2	TC2	1	$2{,}00 \times 10^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-3}$
P1	D2	2	Testkemikalie 2	TC2	1	$2{,}00 \times 10^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-3}$
P1	D3	3	Testkemikalie 2	TC2	1	$2{,}00 \times 10^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-3}$
P1	D4	1	Testkemikalie 2	TC2	2	$2{,}00 \times 10^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-4}$
P1	D5	2	Testkemikalie 2	TC2	2	$2{,}00 \times 10^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-4}$
P1	D6	3	Testkemikalie 2	TC2	2	$2{,}00 \times 10^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-4}$
P1	D7	1	Testkemikalie 2	TC2	3	$2{,}00 \times 10^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-5}$
P1	D8	2	Testkemikalie 2	TC2	3	$2{,}00 \times 10^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-5}$
P1	D9	3	Testkemikalie 2	TC2	3	$2{,}00 \times 10^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-5}$
P1	D10	1	Testkemikalie 2	TC2	4	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	D11	2	Testkemikalie 2	TC2	4	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	D12	3	Testkemikalie 2	TC2	4	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$

Upplägg för brunnar till test av kompetitiv bindning												
Platta	**Position**	**Replikat**	**Brunnstyp**	**Brunnskod**	**Koncentrationskod**	**Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)**	**hrER-stamlösning (µl)**	**Buffertvolym (µl)**	**Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)**	**Volym från spädningsplatta (µl)**	**Slutvolym (µl)**	**Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)**
P1	E1	1	Testkemikalie 2	TC2	5	$2{,}00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-7}$
P1	E2	2	Testkemikalie 2	TC2	5	$2{,}00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-7}$
P1	E3	3	Testkemikalie 2	TC2	5	$2{,}00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-7}$
P1	E4	1	Testkemikalie 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-8}$
P1	E5	2	Testkemikalie 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-8}$
P1	E6	3	Testkemikalie 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-8}$
P1	E7	1	Testkemikalie 2	TC2	7	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-9}$
P1	E8	2	Testkemikalie 2	TC2	7	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-9}$
P1	E9	3	Testkemikalie 2	TC2	7	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-9}$
P1	E10	1	Testkemikalie 2	TC2	8	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-10}$
P1	E11	2	Testkemikalie 2	TC2	8	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-10}$
P1	E12	3	Testkemikalie 2	TC2	8	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-10}$
P1	F1	1	Testkemikalie 3	TC3	1	$2{,}00 \times 10^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-3}$
P1	F2	2	Testkemikalie 3	TC3	1	$2{,}00 \times 10^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-3}$
P1	F3	3	Testkemikalie 3	TC3	1	$2{,}00 \times 10^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-3}$
P1	F4	1	Testkemikalie 3	TC3	2	$2{,}00 \times 10^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-4}$
P1	F5	2	Testkemikalie 3	TC3	2	$2{,}00 \times 10^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-4}$
P1	F6	3	Testkemikalie 3	TC3	2	$2{,}00 \times 10^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-4}$
P1	F7	1	Testkemikalie 3	TC3	3	$2{,}00 \times 10^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-5}$
P1	F8	2	Testkemikalie 3	TC3	3	$2{,}00 \times 10^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-5}$
P1	F9	3	Testkemikalie 3	TC3	3	$2{,}00 \times 10^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-5}$
P1	F10	1	Testkemikalie 3	TC3	4	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	F11	2	Testkemikalie 3	TC3	4	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	F12	3	Testkemikalie 3	TC3	4	$2{,}00 \times 10^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-6}$

Upplägg för brunnar till test av kompetitiv bindning

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
P1	G1	1	Testkemikalie 3	TC3	5	$2{,}00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-7}$
P1	G2	2	Testkemikalie 3	TC3	5	$2{,}00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-7}$
P1	G3	3	Testkemikalie 3	TC3	5	$2{,}00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-7}$
P1	G4	1	Testkemikalie 3	TC3	6	$2{,}00 \times 10^{-8}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-8}$
P1	G5	2	Testkemikalie 3	TC3	6	$2{,}00 \times 10^{-8}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-8}$
P1	G6	3	Testkemikalie 3	TC3	6	$2{,}00 \times 10^{-8}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-8}$
P1	G7	1	Testkemikalie 3	TC3	7	$2{,}00 \times 10^{-9}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-9}$
P1	G8	2	Testkemikalie 3	TC3	7	$2{,}00 \times 10^{-9}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-9}$
P1	G9	3	Testkemikalie 3	TC3	7	$2{,}00 \times 10^{-9}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-9}$
P1	G10	1	Testkemikalie 3	TC3	8	$2{,}00 \times 10^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-10}$
P1	G11	2	Testkemikalie 3	TC3	8	$2{,}00 \times 10^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-10}$
P1	G12	3	Testkemikalie 3	TC3	8	$2{,}00 \times 10^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0 \times 10^{-10}$
P1	H1	1	Noretynodrel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	Noretynodrel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	Noretynodrel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	Noretynodrel	NE		$1{,}00 \times 10^{-4,5}$	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	Noretynodrel	NE		$1{,}00 \times 10^{-4,5}$	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	Noretynodrel	NE		$1{,}00 \times 10^{-4,5}$	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	Icke-radioaktiv E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	Icke-radioaktiv E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	Icke-radioaktiv E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	Icke-radioaktiv E2 S			$1{,}00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	Icke-radioaktiv E2 S			$1{,}00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	Icke-radioaktiv E2 S			$1{,}00 \times 10^{-7}$	40	0	40	80	160	

Tillägg 3

CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTES (CERI) IN VITRO-TEST AV ÖSTROGENRECEPTORBINDNING MED HUMANT, REKOMBINANT, LIGANDBINDANDE ERA-DOMÄNPROTEIN

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR (SE ÄVEN ALLMÄN INLEDNING)

1. Detta in vitro-test av mättnad hos och kompetitiv bindning till östrogenreceptor (ERα) använder sig av den ligandbindande domänen (LBD) hos det humana ERα (hrERα). Denna proteinmodell har framställts av Chemicals evaluation research institute (CERI), Japan, och är ett glutation-S-transferas- (GST) fusionsprotein som uttrycks i *E. coli*. Protokollet prövades i en internationell valideringsstudie som involverade flera laboratorier (2) och vilken visade dess relevans och pålitlighet för det avsedda syftet.

2. Detta test är ett screeningförfarande för identifiering av ämnen som kan binda till hrERα. Det används för att fastställa en testkemikalies förmåga att konkurrera med 17β-östradiol i bindning till hrERα:s ligandbindande domän. Kvantitativa testresultat kan omfatta IC_{50} (ett mått på den koncentration av testkemikalie som behövs för att tränga bort hälften av [^{3}H]-17β-östradiolen från hrERα) och testkemikaliernas relativa bindningsaffiniteter för hrERα, jämförda med den hos 17β-östradiol. För kemisk screening kan godtagbara kvalitativa testresultat omfatta klassificeringar av testkemikalier som antingen hrERα-bindare, icke-bindare eller tvetydiga, utifrån de kriterier som beskrivits för bindningskurvorna.

3. Testet använder en radioaktiv ligand, vilket kräver att laboratoriet har licens för att hantera radioaktiva material. Allt handhavande av radioisotoper och farliga kemikalier ska följa de regelverk och rutiner som föreskrivs av nationell lagstiftning.

4. Läs "**ALLMÄN INLEDNING**" och "**hrER-BINDNINGSTESTETS DELAR**" innan testet används för tillsynsändamål. Definitioner och förkortningar som används i denna testriktlinje beskrivs i tillägg 1.

TESTETS PRINCIP (SE ÄVEN ALLMÄN INLEDNING)

5. Bindningstestet med hrERα mäter förmågan hos radioaktivt inmärkt ligand ([^{3}H]-17β-östradiol) att binda till ER i närvaron av ökande koncentrationer av testkemikalie (dvs. konkurrerande ligand). Testkemikalier med hög affinitet för ER konkurrerar med den radioaktivt inmärkta liganden vid en lägre koncentration än de kemikalier som har lägre affinitet för receptorn.

6. Detta test består av två huvuddelar: ett mättnadsbindningsexperiment för att karakterisera receptor–ligandinteraktionsparametrar, följt av ett kompetitivt bindningsexperiment som karakteriserar konkurrensen mellan en testkemikalie och en radioaktivt inmärkt ligand vid inbindning till ER.

7. Mättnadsbindningsexperimentets syfte är att inför det kompetitiva bindningsexperimentet karakterisera en receptorsats med avseende på bindningsaffinitet och antal receptorer. Mättnadsbindningsexperimentet mäter, vid jämviktsförhållanden och en fast receptorkoncentration, östrogenreceptorns affinitet för dess naturliga ligand (mätt som dissociationskonstant, Kd) och koncentrationen av aktiva bindningsplatser (Bmax).

8. Det kompetitiva bindningsexperimentet mäter benägenheten hos ett ämne att konkurrera med [^{3}H]-17β-östradiol om att binda till ER. Affiniteten kvantifieras genom koncentrationen av testkemikalie som, vid jämvikt, hämmar 50 % av den specifika bindningen av [^{3}H]-17β-östradiol (kallad hämmande koncentration 50 %, eller IC_{50}). Detta kan också utvärderas med hjälp av den relativa bindningsaffiniteten (RBA, affiniteten jämförd med IC_{50} för östradiol som mäts separat i samma testomgång). Det kompetitiva bindningsexperimentet mäter bindningen av [^{3}H]-17β-östradiol vid en fast koncentration i närvaron av ett stort intervall (åtta tiopotenser) av testkemikaliekoncentrationer. Data anpassas sedan, där så är möjligt, till en form av Hill-ekvationen (Hill, 1910) som beskriver bortträngningen av den radioaktivt märkta liganden av en kompetitiv bindare som binder till en bindningsplats. Den utsträckning i vilken den radioaktivt inmärkta östradiolen trängs bort vid jämvikt används för att karakterisera testkemikalien som en bindare, en icke-bindare eller med tvetydig respons.

FÖRFARANDE

Fastställande av acceptabel proteinfunktion hos hrERα

9. Innan rutinmässiga tester av mättnad och kompetitiv bindning genomförs ska varje ny sats av hrERα visas fungera korrekt i det laboratorium där den ska användas. En tvåstegsprocedur bör användas för att kontrollera prestanda. Dessa steg är som följer:

— Utför ett mättnadsbindningstest med [^{3}H]-17β-östradiol för att fastställa specificitet och mättnad hos hrERα. Icke-linjär regressionsanalys av dessa data (t.ex. BioSoft, McPherson, 1985, Motulsky, 1995) och påföljande Scatchard-diagram ska dokumentera [^{3}H]-17β-östradiolens bindningsaffinitet för hrERα (Kd) samt antalet receptorer (Bmax) för varje sats av hrERα.

— Genomför ett kompetitivt bindningstest med hjälp av kontrollämnen (referensöstrogen, 17β-östradiol), en svag bindare (t.ex. noretynodrel eller noretindron) och en icke-bindare (oktyltrietoxisilan, OTES). Varje laboratorium ska upprätta en historisk databas för att dokumentera överensstämmelsen hos IC_{50} och andra relevanta värden för referensöstrogenet och svaga bindaren, mellan olika experiment och olika hrERα-satser. Dessutom ska parametrarna för kontrollämnenas kurvor över kompetitiv bindning vara inom gränserna för 95-procentigt konfidensintervall (se tabell 1), vilka har tagits fram med data från laboratorier som deltog i valideringsstudien för detta test (2).

Tabell 1

Prestandakriterier framtagna för referensöstrogen och svag bindare, CERI-hrER-bindningstest

Ämne	Parameter	Medelvärde [a]	Standardavvikelse (n)	95 % konfidensintervall [b]	
				Nedre gräns	Övre gräns
17β-östradiol.	Topp	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Botten	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hill-koefficient (Hill slope)	−1,22	0,20 (70)	−1,27	−1,17
	Log(IC_{50})-värde	−8,93	0,23 (70)	−8,98	−8,87
Noretynodrel	Topp	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Botten	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hill-koefficient (Hill slope)	−1,04	0,21 (68)	−1,09	−0,99
	Log(IC_{50})-värde	−6,19	0,40 (68)	−6,29	−6,10
Noretindron [c]	Topp	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Botten	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hill-koefficient (Hill slope)	−1,18	0,32 (23)	−1,31	−1,04
	Log(IC_{50})-värde	−6,01	0,54 (23)	−6,25	−5,78

[a] Medelvärde ± standardavvikelse (SD) med provantal (n) beräknades genom skattning av kurvanpassningsparametrar (fyraparameters Hill-ekvation) för kontrollomgångar som utförts av fyra laboratorier under valideringsstudien (se bilaga N i referens 2).
[b] Gränserna för 95-procentigt konfidensintervall anges som en vägledning för acceptanskriterier.
[c] Test av noretindron var valfritt för deluppgift 4 under valideringsstudien (se referens 2, deluppgift 4). Således beräknades medelvärdet ± SD (n) med hjälp av skattade kurvanpassningar (fyraparameters Hill-ekvation) för kontrollomgångar, utförda av två laboratorier.
Intervallet för IC_{50} kommer att vara beroende av receptorberedningens Kd och koncentrationen av radioaktivt inmärkt ligand som används vid de olika laboratorierna. Lämplig justering för IC_{50}-intervallet, baserad på de betingelser som används för att genomföra testet, kommer att kunna godtas.

Demonstration av laboratoriets kompetens

10. Se punkterna 17 och 18 och tabell 2 i "**hrER-BINDNINGSTESTETS DELAR**" i denna testmetod. Varje test (mättnad och kompetitiv bindning) ska bestå av tre oberoende testomgångar (dvs. med nya spädningar av receptor, kemikalier och reagens) på olika dagar och varje omgång ska innehålla tre replikat.

Bestämning av hrERα-koncentration

11. Koncentrationen av aktiv receptor varierar något mellan satser och med förvaringsförhållanden. Därför ska koncentrationen av aktiv receptor som erhållits från leverantören fastställas. Detta ger tillämplig koncentration av aktiv receptor när testomgången ska göras.

12. Under förhållanden som motsvarar kompetitiv bindning (dvs. 0,5 nM [^{3}H]-inmärkt östradiol), ska nominella koncentrationer om 0,1, 0,2, 0,4 och 0,6 nM receptor inkuberas i frånvaro (total bindning) och närvaro (icke-specifik bindning) av 1 µM ej inmärkt östradiol. Specifik bindning, beräknad som differensen av total och icke-specifik bindning, ritas i ett diagram mot den nominella receptorkoncentrationen. Den receptorkoncentration som ger specifika bindningsvärden motsvarande 40 % av tillsatt radioaktivt inmärkt ligand relateras till motsvarande receptorkoncentration, och denna receptorkoncentration ska användas för tester av mättnad och kompetitiv bindning. Ofta överensstämmer en slutlig hrER-koncentration på 0,2 nM med detta förhållande.

13. Om 40-procentskriteriet vid upprepade försök inte kan uppfyllas ska experimentets uppställning kontrolleras för möjliga fel. Svårigheter att uppnå 40-procentskriteriet kan indikera att det finns väldigt lite aktiv receptor i satsen med rekombinant receptor och man bör då överväga att använda en annan sats.

Mättnadstest

14. Åtta ökande koncentrationer av [^{3}H]-17β-östradiol ska utvärderas i tripletter, enligt följande tre betingelser (se tabell 2):

    a. I frånvaron av ej inmärkt 17β-östradiol och närvaro av ER. Här fastställs total bindning genom att mäta radioaktiviteten i de brunnar som enbart innehåller [^{3}H]-17β-östradiol.

    b. I närvaron av 2000 gångers koncentrationsöverskott av ej inmärkt 17β-östradiol över inmärkt 17β-östradiol och närvaro av ER. Avsikten med denna betingelse är att mätta de aktiva bindningsplatserna med ej inmärkt 17β-östradiol och, genom att mäta radioaktiviteten i brunnarna, fastställa den icke-specifika bindningen. Eventuellt kvarvarande radioaktiv östradiol som kan binda till receptorn anses binda till en icke-specifik bindningsplats eftersom den tillsatta icke-radioaktiva östradiolen ska ha så hög koncentration att den har bundit till alla specifika bindningsplatser på receptorn.

    c. I frånvaro av ej inmärkt 17β-östradiol och frånvaro av ER (fastställande av total radioaktivitet).

Beredning av lösningar med [^{3}H]-17β-östradiol respektive ej inmärkt 17β-östradiol och hrERα

15. En 40 nM lösning av [^{3}H]-17β-östradiol ska beredas från en 1 µM stamlösning av [^{3}H]-17β-östradiol i DMSO, genom att tillsätta DMSO (för att bereda 200 nM) och testbuffert vid rumstemperatur (för att bereda 40 nM). Med hjälp av denna 40 nM-lösning, bereds seriespädningen av [^{3}H]-17β-östradiol i koncentrationer från 0,313 nM till 40 nM med rumstempererad testbuffert (som angivet i kolumn 12 i tabell 2). De slutliga testkoncentrationerna, från 0,0313 nM till 4,0 nM, erhålls genom att tillsätta 10 µl av dessa lösningar till respektive testbrunnar i en 96-hålsmikrotiterplatta (se tabellerna 2 och 3) Beredning av testbuffert, beräkning av ursprunglig stamlösning av [^{3}H]-17β-östradiol utifrån dess specifika aktivitet, beredning av spädningar och fastställande av koncentrationer beskrivs i detalj i CERI-protokollet (2).

16. Spädningar av ej inmärkta 17β-östradiollösningar ska beredas från en 1 nM 17β-östradiol-stamlösning genom att tillsätta testbuffert och på så sätt erhålla åtta ökande koncentrationer, initialt från 0,625 µM till 80 µM. De slutliga testkoncentrationerna, från 0,0625 till 8 µM, erhålls genom att tillsätta 10 µl av dessa lösningar till respektive testbrunnar i en 96-hålsmikrotiterplatta som reserverats för att mäta icke-specifik bindning (se tabellerna 2 och 3). Beredning av spädningar av ej inmärkt 17β-östradiol beskrivs i detalj i CERI-protokollet (2).

17. Den receptorkoncentration som ger specifik bindning av 40 ± 10 % bör användas (se punkterna 12–13). Lösningen med hrERα ska beredas med iskall testbuffert omedelbart före dess användning, det vill säga efter att alla brunnar för total bindning, icke-specifik bindning och enbart radioaktiv ligand har beretts.

18. Förbered 96-hålsmikrotiterplattorna enligt schema i tabell 2, med 3 replikat per [^{3}H]-17β-östradiolkoncentration. Fördelning över plattan av volymer av [^{3}H]-17β-östradiol, ej inmärkt 17β-östradiol, buffert och receptor ges i tabell 3.

Tabell 2

Upplägg för mikrotiterplatta till mättnadsbindningstest

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	För mätning av TB			För mätning av NSB			För kvantitativ analys av enbart radioaktiv ligand				Ej inmärkta E2-spädningar för plattkolumn 4–6	[^{3}H]E2-spädningar för plattkolumn 1–9
A	0,0313 nM [^{3}H]E2 + ER			0,0313 nM [^{3}H]E2 + 0,0625 µM E2 + ER			0,0313 nM				0,625 µM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H]E2+ ER			0,0625 nM [^{3}H]E2+ 0,125 µM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 µM	0,625 nM
C	0,125 nM [^{3}H]E2+ ER			0,125 nM [^{3}H]E2+ 0,25 µM E2+ ER			0,125 nM				2,5 µM	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3}H]E2+ ER			0,250 nM [^{3}H]E2+ 0,5 µM E2+ ER			0,250 nM				5 µM	2,5 nM
E	0,50 nM [^{3}H]E2+ ER			0,50 nM [^{3}H]E2+ 1 µM E2+ ER			0,50 nM				10 µM	5 nM
F	1,00 nM [^{3}H]E2+ ER			1,00 nM [^{3}H]E2+ 2 µM E2+ ER			1,00 nM				20 µM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H]E2+ ER			2,00 nM [^{3}H]E2+ 4 µM E2+ ER			2,00 nM				40 µM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H]E2+ ER			4,00 nM [^{3}H]E2+ 8 µM E2+ ER			4,00 nM				80 µM	40 nM

TB: Total bindning.
NSB: Icke-specifik bindning.
[^{3}H]E2: [^{3}H]-17β-östradiol.
E2: ej inmärkt 17β-östradiol.
(*) Här angivna koncentrationer är slutkoncentrationerna i varje brunn.
(**) Spädningarna av ej inmärkt E2 och [^{3}H]E2 kan beredas i en annan platta.

Tabell 3

Volymer för reagenser till mättnadstest i mikrotiterplatta

Kolumn-nummer		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Beredningssteg		TB-brunnar			NSB-brunnar			Endast radioaktivt märkt ligand		
Volymer för beståndsdelar till ovannämnda reaktionsbrunnar och turordning för tillsats	Buffert	60 µl			50 µl			90 µl		
	Ej inmärkt E2 från kolumn 11 i tabell 2	–			10 µl			–		
	[^{3}H]E2 från kolumn 12 i tabell 2	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			–		
Total reaktionsvolym		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubation		**EFTER 2 TIMMARS INKUBATION**						Kvantifiering av radioaktiviteten precis efter beredning. Ingen inkubation		
Behandling med 0,4 % DCC		Ja			Ja			**Nej**		
Volym av 0,4 % DCC		100 µl			100 µl			–		
Filtrering		Ja			Ja			Nej		
DPM-MÄTNING										
Kvantifieringsvolym att tillsätta till scintillationsblandningen		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Om en vätskescintillationsräknare för mikrotiterplattor används för dpm-mätning är det inte lämpligt att bereda enbart radioaktivt märkt ligand i samma platta som TB och NSB. Den radioaktivt märkta liganden ska beredas separat i en annan platta.
(**) Om centrifugering används för att avskilja DCC bör de 50 µl supernatant mätas i vätskescintillationsräknare för att undvika att DCC förorenar provet.

19. Testmikrotiterplattor avsedda för bestämning av total bindning och icke-specifik bindning bör inkuberas vid rumstemperatur (22 °C till 28 °C) i två timmar.

Mätning av [^{3}H]-17β-östradiol bunden till hrERα

20. Efter två timmars inkubation ska den [^{3}H]-17β-östradiol som bundit till hrERα separeras från obunden [^{3}H]-17β-östradiol genom tillsats av 100 µl iskall 0,4 % DCC-suspension till brunnarna. Plattorna ska då placeras på is i 10 minuter och reaktionsblandningen och DCC-suspensionen filtreras, genom att överföras till ett mikrotiterplattefilter, för att avlägsna DCC. Därefter ska 100 µl av filtratet tillsättas till scintillationsvätskan i scintillationsvialer för bestämning av sönderfall per minut (disintegrations per minute, dpm) i varje vial med hjälp av vätskescintillationsräknare.

21. Alternativt, om mikrotiterplattefilter inte finns att tillgå, kan DCC avlägsnas genom centrifugering. Sedan tas 50 µl supernatant, innehållande den hrERα-bundna [^{3}H]-17β-östradiolen, extremt försiktigt så att man inte råkar förorena brunnarna genom att vidröra DCC och används för scintillationsräkning.

22. Betingelsen med enbart radioaktivt märkt ligand används för att fastställa sönderfall per minut (dpm) hos den [^{3}H]-17β-östradiol som har tillsatts till testbrunnarna. Radioaktiviteten ska kvantifieras precis efter beredning. Dessa brunnar ska inte inkuberas och inte heller behandlas med DCC-suspension utan tillsättas direkt till scintillationsvätskan. Dessa mätningar visar, i dpm, hur mycket [^{3}H]-17β-östradiol som tillsattes till varje uppsättning brunnar för total bindning och icke-specifik bindning.

Kompetitivt bindningstest

23. Det kompetitiva bindningstestet mäter bindningen av [^{3}H]-17β-östradiol vid en viss koncentration i närvaro av ökande koncentration av testkemikalie. Tre parallella replikat bör användas för varje koncentration i varje testomgång. Dessutom bör tre icke-parallella testomgångar utföras för varje testad kemikalie. Testet bör utföras i en eller flera 96-hålsmikrotiterplattor.

Kontroller

24. Varje experiment ska inkludera parallella lösningsmedelprover och kontroller (dvs. referensöstrogen, svag bindare och icke-bindare). Fullständiga koncentrationskurvor för östrogenreferens och kontroller (dvs. svag bindare resp. icke-bindare) ska placeras i en platta vid varje testomgång. Alla andra plattor ska innehålla: i) en hög koncentration (maximal bortträngning, dvs. ungefär fullständig bortträngning av radioaktivt inmärkt ligand) och en mellankoncentration (ungefär IC_{50}) av E2 respektive svag bindare i tripletter, ii) lösningsmedelskontroll och icke-specifik bindning, båda som tripletter. Förfaranden för beredning av testbuffert [^{3}H]-17β-östradiol, hrERα och testkemikalielösningar beskrivs ingående i CERI-protokollet (2).

Lösningsmedelskontroll

25. Lösningsmedelskontrollen indikerar att lösningsmedlet inte interagerar med testsystemet och mäter också total bindning (TB). Det mest lämpliga lösningsmedlet är DMSO. Men om testkemikaliens högsta koncentration inte är löslig i DMSO kan etanol användas. Koncentrationen av DMSO i de slutliga testbrunnarna ska vara 2,05 % och kan ökas till 2,5 % om testkemikalien visar bristande löslighet. Koncentrationer av DMSO över 2,5 % ska inte användas eftersom högre koncentrationer av lösningsmedel interfererar med testet. Till testkemikalier som inte är lösliga i DMSO men lösliga i etanol kan ett maximum av 2 % etanol användas i testet utan interferens.

Buffertkontroll

26. Buffertkontrollen (BC) ska inte innehålla vare sig lösningsmedel eller testkemikalie men testets alla övriga ingående delar. Resultaten för buffertkontrollen jämförs med lösningsmedelskontrollen för att säkerställa att det valda lösningsmedlet inte påverkar testsystemet.

Stark bindare (referensöstrogen)

27. Den endogena liganden är 17β-östradiol (CAS-nr 50-28-2) och den binder med hög affinitet till alfa-subtypen av ER. En standardkurva med ej inmärkt 17β-östradiol ska upprättas för varje kompetitivt hrERα-bindningstest, för att möjliggöra en bedömning av variationen när testet, över tid, upprepas i samma laboratorium. Åtta lösningar av ej inmärkt 17β-östradiol ska beredas i DMSO och testbuffert för att användas till standardkurvan, med slutlig koncentration i testbrunnarna och spridning som följer: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. Den högsta koncentrationen av ej inmärkt 17β–östradiol (1 μM) bör tjäna som indikator för icke-specifik bindning. Denna koncentration markeras med märkningen ”NSB” i tabell 4 även om den också är en del av standardkurvan.

Svag bindare

28. En svag bindare (noretynodrel [CAS-nr 68-23-5] eller alternativt noretindron [CAS-nr 68-22-4]) bör inkluderas för att påvisa varje experiments känslighet och möjliggöra en bedömning av variation när testet används längre perioder. Åtta lösningar av den svaga bindaren ska beredas i DMSO och testbuffert för att användas till standardkurvan, med slutlig koncentration i testbrunnarna som följer: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} och 10^{-9} M.

Icke-bindare

29. Oktyltrietoxisilan (OTES, CAS-nr 2943-75-1) ska användas som negativ kontroll (icke-bindare). Den ger återkoppling om att testet, så som det utförs, kommer att detektera testkemikalier som inte binder till hrERα. Åtta lösningar av icke-bindaren ska beredas i DMSO och testbuffert för att användas till standardkurvan, med slutlig koncentration i testbrunnarna som följer: 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Di-n-butylftalat (DBP, CAS-nr 84-72-2) kan användas som alternativ icke-bindare, men är endast testad upp till 10^{-4} M. Maximal löslighet för DBP i testet har visats vara 10^{-4} M.

hrERα-koncentration

30. Den mängd receptor som ger en specifik bindning på 40 ± 10 % bör användas (se punkterna 12–13 i tillägg 3). Lösningen med hrERα ska beredas genom spädning av funktionellt hrERα i iskall testbuffert, omedelbart före användning.

[^{3}H]-17β-östradiol

31. Slutkoncentrationen av [^{3}H]-17β-östradiol i testbrunnarna bör vara 0,5 nM.

Testkemikalier

32. Vid det första tillfället är det nödvändigt att genomföra ett löslighetstest för att fastställa löslighetsgränsen för varje testkemikalie och för att identifiera lämpligt koncentrationsintervall att använda sig av under testet. Samtliga testkemikaliers respektive löslighetsgräns i lösningsmedlet ska fastställas initialt och vidare bekräftas under testbetingelser. Den i testet testade slutkoncentrationen bör inte överstiga 1 mM. Intervallsökning omfattar en lösningsmedelskontroll och minst åtta logaritmiska seriespädningar, som börjar vid maximal acceptabel koncentration (t.ex. 1 mM eller lägre, baserat på löslighetsgräns), och närvaron av iakttagen grumlighet eller fällning (se även punkt 35 i tillägg 3). När koncentrationsintervallet för testet har fastställts, ska en testkemikalie testas med åtta logaritmiska koncentrationer, lämpligt utspridda enligt definitionen i det föregående intervallsökningstestet. Koncentrationer i det andra och tredje experimenten bör, vid behov, anpassas ytterligare för en bättre identifiering av koncentration–responskurvan.

33. Spädningar av testkemikalien ska beredas i lämpligt lösningsmedel (se punkt 25 i tillägg 3). Om testkemikaliens högsta koncentration inte är löslig i vare sig DMSO eller etanol, och en tillsats av mer lösningsmedel skulle göra att koncentrationen av lösningsmedel i det slutliga provröret överskred den godtagbara gränsen, kan den högsta koncentrationen sänkas till nästa lägre koncentration. I sådana fall kan ytterligare en koncentration läggas till i den lägre änden av koncentrationsserien. Övriga koncentrationer i serien bör förbli oförändrade.

34. Testkemikalielösningarna ska iakttas noggrant vid tillsatsen till testbrunnen, eftersom testkemikalien kan fälla ut i detta steg. Data för alla brunnar som innehåller en fällning ska uteslutas från kurvanpassning och anledningen till uteslutningen av data noteras.

35. Om det sedan tidigare från andra källor finns information som tillhandahåller ett log(IC_{50})-värde för en testkemikalie, kan det vara lämpligt att geometriskt sprida spädningarna närmre runt det förväntade log(IC_{50})-värdet (dvs. 0,5 logenheter). Slutresultaten bör återspegla tillräcklig spridning av koncentrationer på båda sidor om log(IC_{50})-värdet, inklusive ”topp” och ”botten”, så att bindningskurvan kan karakteriseras tillfredsställande.

Organisering av testplattor

36. Märkta mikrotiterplattor ska beredas för sexfaldiga inkubationer med lösningsmedelskontrollen, den högsta koncentrationen av referensöstrogen (E2) som också tjänar som indikator på icke-specifik bindning (NSB), buffertkontrollen, och trefaldiga inkubationer för var och en av de åtta koncentrationerna av icke-bindande kontroll (oktyltrietoxisilan), de sju lägre koncentrationerna av referensöstrogenet (E2), de åtta koncentrationerna av svag bindare (noretynodrel eller noretindron) och de åtta koncentrationerna av varje testkemikalie (TC). Ett exempel på upplägget med plattschema över fullständiga koncentrationskurvor för referensöstrogenet och kontroller ges nedan i tabell 4. Ytterligare mikrotiterplattor används för testkemikalierna och ska inkludera plattkontroller, det vill säga i) en hög koncentration (maximal bortträngning) och en mellankoncentration (ungefär IC_{50}) av vardera E2 och svag bindare i triplikat, ii) lösningsmedelskontroll (som total bindning) och icke-specifik bindning, båda sexfaldiga (tabell 5). Ett exempel på plattupplägg för ett kompetitivt test med tre okända testkemikalier ges i tillägg 3.3. De koncentrationer som anges i tabellen, samt i tabeller 4 och 5, avser slutkoncentrationer i testbrunnarna. Maximal koncentration för E2 ska vara 1×10^{-7} M och för den svaga bindaren bör den högsta koncentrationen som används för den svaga bindaren på platta 1 användas. Laboratoriet ska fastställa IC_{50} med hjälp av sin historiska kontrolldatabas. Detta värde kan förväntas vara jämförbart med det som iakttagits i valideringsstudierna (se tabell 1).

Tabell 4

Upplägg för mikrotiterplatta till kompetitivt bindningstest [1] [2]**, fullständiga koncentrationskurvor för referensöstrogen och kontroller (platta 1)**

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Buffertkontroll och positiv kontroll (E2)			Svagt positiv (Noretynodrel)			Negativ kontroll (OTES)			TB och NSB		
A	Blankprov (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (lösningsmedelskontroll) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1 \times 10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1 \times 10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Buffertkontroll		
F	E2 ($1 \times 10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1 \times 10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Blankprov (radioaktivitet) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1 \times 10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

(1) Provuppsättning för standard-mikrotiterplatta som ska ingå i varje experiment.
(2) Notera att denna mikrotiterplatta ställs i ordning genom att använda de spädningar i spädningsplattan som beskrevs för standarder i föregående avsnitt.
I detta exempel är den svaga bindaren noretinodrel (NE).
(*) Faktiskt blankprov, brunnen används inte.
(**) Blankprov, används inte under inkubationen, men för att bekräfta total, tillsatt radioaktivitet.

Tabell 5

Upplägg för mikrotiterplatta till kompetitivt bindningstest, tillkommande plattor för testkemikalier (TC) och plattkontroller

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Testkemikalie 1 (TC-1)			Testkemikalie-2 (TC-2)			Testkemikalie-3 (TC-3)			Kontroller		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7} M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E2 (IC_{50})		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1 \times 10^{-4,5}$ M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			(TB) (Lösningsmedelskontroll)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

I detta exempel är den svaga bindaren noretinodrel (NE).

Slutförande av kompetitivt bindningstest

37. Med undantag för brunnarna för total bindning och blankprov (för radioaktiv märkning), så som visas i tabell 6, ska 50 µl av testbufferten överföras till varje brunn och blandas med 10 µl lösningsmedelskontroll, referensöstrogen (E2), svag bindare, icke-bindare eller testkemikalier och 10 µl av en 5 nM [^{3}H]-17β-östradiollösning. Sedan tillsätts 30 µl iskall receptorlösning till varje platta och blandas försiktigt. Lösningen med hrERα ska vara den sista reagens som tillsätts till brunnarna. Testmikrotiterplattorna inkuberas i rumstemperatur (22–28 °C) i 2 timmar.

Tabell 6

Tillsatsvolymer av beståndsdelar till kompetitivt bindningstest för hrER, i mikrotiterplattor

Beredningssteg		Andra än TB-brunnar	TB-brunnar	Blankprov (för radioaktiv märkning)
Volymer för beståndsdelar till ovannämnda reaktionsbrunnar och turordning för tillsats	Rumstempererad testbuffert	50 µl	60 µl	90 µl
	Ej inmärkt E2, svag bindare, icke-bindare, lösningsmedel och testkemikalier (*)	10 µl	—	—
	[^{3}H]-17β-östradiol för att ge en slutkoncentration på 0,5 nM (dvs. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	Fastställd hrERα-koncentration (se punkterna 12–13)	30 µl	30 µl	–
Total volym i varje testbrunn		100 µl	100 µl	100 µl

(*) Korrekt beredda så att de ger slutkoncentration inom godtagbar lösningsmedelskoncentration.

38. Kvantifieringen av [^{3}H]-17β-östradiol bunden till hrERα, efter separation av [^{3}H]-17β-östradiol bunden till hrERα från fri [^{3}H]-17β-östradiol genom tillsats av 100 µl av iskall DCC-suspension till varje brunn, bör sedan utföras enligt instruktioner för mättnadsbindningstestet, i punkterna 21–23 i tillägg 3.

39. Brunnarna G10–12 och H10–12 (identifierade som blankprov [för radioaktiv märkning] i tabell 4) anger dpm för [^{3}H]-inmärkt östradiol i 10 µl. Dosen om 10 µl bör överföras direkt till scintillationsvätskan.

Acceptanskriterier

Mättnadsbindningstest

40. Den specifika bindningskurvan bör nå en platå med ökande koncentrationer av [^{3}H]-17β-östradiol, indikerande mättnad av hrERα med ligand.

41. Den specifika bindningen vid 0,5 nM av [^{3}H]-17β-östradiol bör vara inom acceptansintervallet 30–50 % för genomsnittet av uppmätt total tillsatt radioaktivitet från de olika testomgångarna. Enstaka mindre avvikelser utanför detta intervall kan godtas, men om testomgångar konsekvent faller utanför intervallet eller om en viss omgång signifikant faller utanför intervallet bör proteinkoncentrationen justeras och mättnadstestet upprepas.

42. Data bör bilda ett linjärt Scatchard-diagram.

43. Den icke-specifika bindningen bör inte vara överdrivet stor. Storleken på den icke-specifika bindningen bör normalt vara < 35 % av den totala bindningen. Men kvoten kan emellanåt överskrida denna gräns vid mätningar av mycket låga dpm-tal för den lägsta koncentrationen av testad radioaktivt inmärkt 17β-östradiol.

Kompetitivt bindningstest

44. Ökande koncentrationer av ej inmärkt 17β-östradiol bör tränga bort [^{3}H]-17β-östradiol från receptorn på ett sätt som överensstämmer med kompetitiv bindning till en bindningsplats.

45. Den hämmande koncentrationen, IC_{50}, för referensöstrogenet (dvs. 17β-östradiol) bör ungefär motsvara den molära koncentrationen för [^{3}H]-17β-östradiol plus Kd-värdet, som fastställts vid mättnadsbindningstestet.

46. Den totala specifika bindningen bör genomgående hamna inom acceptansintervallet på 40 ± 10 % när den genomsnittliga uppmätta totala radioaktiva koncentrationen, som har tillsatts till varje brunn, har varit 0,5 nM vid flera testomgångar. Enstaka mindre avvikelser utanför detta intervall kan godtas, men om testomgångar konsekvent faller utanför intervallet eller om en viss omgång signifikant hamnar utanför intervallet bör proteinkoncentrationen justeras.

47. Lösningsmedlet bör inte påverka vare sig testets känslighet eller reproducerbarhet. Resultaten för lösningsmedelskontrollen (TB-brunnar) jämförs med buffertkontrollen för att säkerställa att det valda lösningsmedlet inte påverkar testsystemet. Om lösningsmedlet inte har någon effekt på testet bör resultaten för TB och buffertkontroll vara jämförbara.

48. Icke-bindaren bör inte tränga bort mer än 25 % av [^{3}H]-17β-östradiolen från hrERα när den testas upp till 10^{-3} M (OTES) eller 10^{-4} M (DBP).

49. Prestandakriterier utarbetades för referensöstrogenet och två svaga bindare (t.ex. noretynodrel, noretindron) med hjälp av data från valideringsstudien av CERI-hrER-bindningstestet (bilaga N i referens 2). I valideringsstudien uppges 95-procentiga konfidensintervall för genomsnittet ± SD (n) för de deltagande fyra laboratoriernas alla kontrollomgångar. De 95-procentiga konfidensintervallen beräknades för kurvanpassningsparametrarna (dvs. topp, botten, Hill-koefficient [Hill slope], log[IC_{50}]-värde) för referensöstrogenet och de svaga bindarna, och $\log_{10}$RBA-värdet för de svaga bindarna jämförda med referensöstrogenet. Tabell 1 anger förväntade intervall för kurvanpassningsparametrarna, vilka kan användas som prestandakriterier. I praktiken kan intervallet för IC_{50} variera något med det experimentellt erhållna Kd-värdet för den receptorberedning och ligandkoncentration som använts i testet.

50. Inga prestandakriterier för testkemikaliernas kurvanpassningsparametrar utarbetades på grund av den stora mängden möjliga testkemikalier och deras variation i möjliga affiniteter och utfall (t.ex. fullständig kurva, delkurva, ingen kurvanpassning). Men yrkesmässigt omdöme ska tillämpas vid granskning av resultaten från en testkemikalies alla testomgångar. Vidare ska man använda ett tillräckligt intervall av testkemikaliekoncentration för att klart kunna beskriva toppen (t.ex. 90–100 % bindning) på den kompetitiva bindningskurvan. Variationen mellan replikat vid varje koncentration av testkemikalie, liksom mellan de tre oberoende testomgångarna, ska vara rimlig och vetenskapligt försvarbar. Kontroller från en testkemikalies alla testomgångar bör hålla sig nära de prestandamätningar som har rapporterats för detta CERI-test och överensstämma med historiska kontrolldata från respektive laboratorium.

DATAANALYS

Mättnadsbindningstest

51. Både total och icke-specifik bindning mäts. Från dessa värden beräknas specifik bindning av ökande koncentrationer av [^{3}H]-17β-östradiol under jämviktsförhållanden genom att subtrahera icke-specifik från total. Ett diagram över specifik bindning mot [^{3}H]-17β-östradiol-koncentration bör nå en platå för maximal specifik bindning, vilken indikerar ett hrERα mättat av [^{3}H]-17β-östradiol. Dessutom bör dataanalysen klargöra inbindning av [^{3}H]-17β-östradiol till en enda bindningsplats med hög affinitet. Icke-specifik, total och specifik bindning bör illustreras med en mättnadsbindningskurva. Vidare analys av dessa data bör använda sig av icke-linjär regressionsanalys (t.ex. BioSoft, McPherson, 1985, Motulsky, 1995) med en slutlig dataredovisning i form av ett Scatchard-diagram.

52. Dataanalysen bör fastställa Bmax och Kd enbart utifrån totala bindningsdata, med antagandet att den icke-specifika bindningen är linjär, om inte en motivering ges för att använda en annan metod. Dessutom ska robust regression användas i fastställande av bästa anpassning, om inte annat val motiveras. Val av robust regressionsmetod ska anges. Korrigering för liganduttömning (t.ex. med hjälp av Swillens metod 1995) bör alltid användas i fastställande av Bmax och Kd utifrån mättnadsbindningsdata.

Kompetitivt bindningstest

53. Kurvan över kompetitiv bindning ritas som specifik [^{3}H]-17β-östradiol-bindning mot koncentrationen av konkurrerande ligand (log10-enheter). Den koncentration av testkemikalie som hämmar 50 % av den maximala specifika [^{3}H]-17β-östradiol-bindningen är IC_{50}-värdet.

54. Uppskattningar av log(IC_{50})-värden för de positiva kontrollerna (t.ex. referensöstrogen och svag bindare) ska fastställas med hjälp av lämplig programvara för icke-linjär kurvanpassning så att de passar en fyraparameters Hill-ekvation (t.ex. BioSoft, McPherson, 1985, Motulsky, 1995). Kurvans topp, botten, lutning och log(IC_{50})-värde ska i allmänhet lämnas utan restriktion (unconstrained) vid anpassning av dessa kurvor. Robust regression ska användas i fastställande av bästa anpassning, om inte annat val motiveras. Ingen korrigering för liganduttömning ska göras. Efter inledande analys ska varje bindningskurva granskas för att säkerställa korrekt anpassning till modellen. Den svaga bindarens relativa bindningsaffinitet (RBA) beräknas som procentuell andel av dess log(IC_{50})-värde i förhållande till 17β-östradiols log(IC_{50})-värde. Resultat från de positiva kontrollerna och den icke-bindande kontrollen ska utvärderas genom att använda måtten på testprestanda i punkterna 44–49 i detta tillägg 3.

55. Data för alla testkemikalier ska analyseras med en stegvis strategi för att säkerställa att data analyseras korrekt och att varje kurva för kompetitiv bindning klassificeras korrekt. Det är lämpligt att en testkemikalies alla testomgångar initialt underkastas en standardiserad dataanalys som är identisk med den som använts för referensöstrogen och kontroller med svaga bindare (se punkt 54 i detta tillägg 3). När den är klar bör en teknisk granskning av kurvanpassningsparametrarna göras, liksom en visuell granskning av hur väl data stämmer med den genererade kurvan över kompetitiv bindning, för varje testomgång. Under denna tekniska granskning är följande iakttagelser goda indikationer på att testet och dataanalyserna har genomförts korrekt: en koncentrationsberoende minskning i procentuell, specifikt bunden [^{3}H]-17β-östradiol, låg variation mellan de tekniska replikaten för varje kemisk koncentration och överensstämmelse mellan anpassningsparametrarna från de tre testomgångarna.

Tolkning av data

56. Förutsatt att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses en testkemikalie binda till hrERα om data kan anpassas till en bindningskurva och den lägsta punkten på responskurvan, inom dataintervallet, är mindre än 50 % (figur 1).

57. Förutsatt att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda, anses en testkemikalie inte binda till hrERα om

— data kan anpassas till en bindningskurva och den lägsta punkten på responskurvan, inom dataintervallet, är över 75 %, eller

— data inte kan anpassas till en bindningskurva och den lägsta, outjämnade genomsnittliga procentuella bindningen inom datamängdens koncentrationsgrupper är över 75 %.

58. Testkemikalier anses tvetydiga om inget av villkoren ovan uppfylls (t.ex. den lägsta punkten på den anpassade responskurvan ligger mellan 76 % och 51 %).

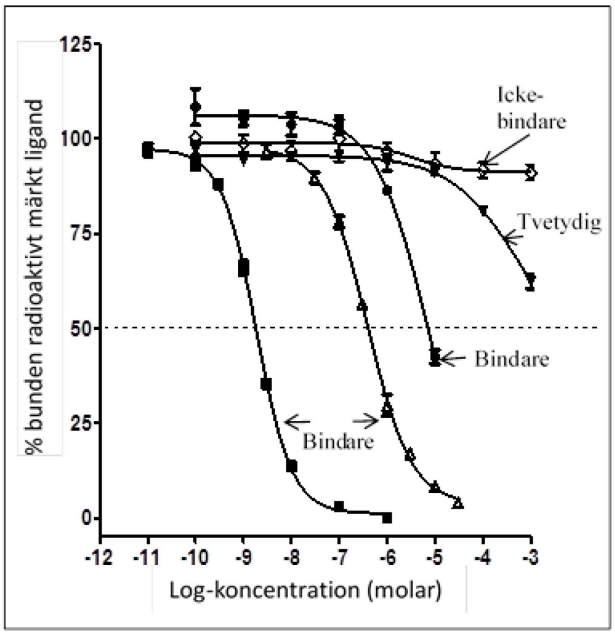
Tabell 7

Kriterier för klassificering utifrån en testkemikalies kurva över kompetitiv bindning

Klassificering	Kriterier
Bindare[a]	Data kan anpassas till en bindningskurva. Den **lägsta punkten på responskurvan, inom dataintervallet, är mindre än 50 %.**
Icke-bindare[b]	Om data kan anpassas till en bindningskurva och den **lägsta punkten på den anpassade responskurvan, inom dataintervallet, är över 75 %.** Om data inte kan anpassas till en bindningskurva och den **lägsta, outjämnade genomsnittliga procentuella bindningen inom datamängdens koncentrationsgrupper är över 75 %.**
Tvetydig[c]	Varje mätbar testomgång som varken är en bindare eller en icke-bindare (t.ex. den lägsta punkten längs den anpassade kurvan ligger mellan 76–51 %).

Figur 1

Exempel på klassificeringar av testkemikalier med hjälp av kurva för kompetitiv bindning.



59. Flera testomgångar genomförda med en viss testkemikalie, i samma laboratorium, kombineras genom att tilldela numeriska värden till varje testomgång och ta fram ett medelvärde enligt tabell 8. Resultaten för de kombinerade testomgångarna inom varje laboratorium jämförs med den förväntade klassificeringen för varje testkemikalie.

Tabell 8

Metod för klassificering av testkemikalier med användning av flera testomgångar inom ett laboratorium

Tilldelning av numeriska värden för enskilda testomgångar:	
Klassificering	**Numeriskt värde**
Bindare	2
Tvetydig	1
Icke-bindare	0
Klassificering av genomsnittligt numeriskt värde vid flera testomgångar:	
Klassificering	**Numeriskt värde**
Bindare	Genomsnitt ≥ 1,5
Tvetydig	0,5 ≤ Genomsnitt < 1,5
Icke-bindare	Genomsnitt < 0,5

TESTRAPPORT

60. Se punkt 24 i ”hrER-BINDNINGSTESTETS DELAR” i denna testmetod.

Tillägg 3.1

TERMER

[^{3}H]E2: 17β-östradiol radioaktivt inmärkt med tritium.

DCC: Dextran-täckt träkol (Dextran-Coated Charcoal).

E2: Ej inmärkt 17β-östradiol (inert).

Testbuffert: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, innehållande 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO3, 10 % glycerol, 0,2 mM leupeptin, 1 mM ditiotreitol och 10 mg/ml bovint serumalbumin.

hrERα: Human rekombinant östrogenreceptor alfa (ligandbindande domän).

Replikat: En av flera brunnar med samma innehåll och koncentrationer vilka testas parallellt inom en enskild testomgång. I detta protokoll testas varje koncentration av testkemikalie i tripletter, det betyder att tre replikat testas samtidigt vid varje koncentration av testkemikalie.

Testomgång: En fullständig uppsättning av parallellt hanterade brunnar i mikrotiterplattor, vilka ger all nödvändig information för att karakterisera en testkemikalies bindning till hrERα (dvs. totalt [^{3}H]-17β-östradiol tillsatt till testbrunnen, maximal bindning hos [^{3}H]-17β-östradiol till hrERα, icke-specifik bindning och total bindning vid olika koncentrationer av testkemikalie). En testomgång kan bestå av så lite som en testbrunn (dvs. ett replikat) per koncentration, men eftersom protokollet kräver tripletter, består en omgång av tre testbrunnar per koncentration. Dessutom kräver detta protokoll tre oberoende (dvs. icke-parallella) testomgångar per kemikalie.

Tillägg 3.2

UPPLÄGG FÖR BRUNNAR TILL TEST AV KOMPETITIV BINDNING

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
Fast	A1	1	Blankprov	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
Fast	A2	2	Blankprov	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
Fast	A3	3	Blankprov	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
Fast	B1	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S1	$1{,}00 \times 10^{-10}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-11}$
Fast	B2	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S1	$1{,}00 \times 10^{-10}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-11}$
Fast	B3	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S1	$1{,}00 \times 10^{-10}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-11}$
Fast	C1	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S2	$1{,}00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-10}$
Fast	C2	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S2	$1{,}00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-10}$
Fast	C3	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S2	$1{,}00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-10}$
Fast	D1	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S3	$3{,}16 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$3{,}2 \times 10^{-10}$
Fast	D2	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S3	$3{,}16 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$3{,}2 \times 10^{-10}$

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
Fast	D3	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S3	$3{,}16 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$3{,}2 \times 10^{-10}$
Fast	E1	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S4	$1{,}00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-9}$
Fast	E2	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S4	$1{,}00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-9}$
Fast	E3	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S4	$1{,}00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-9}$
Fast	F1	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S5	$3{,}16 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$3{,}2 \times 10^{-9}$
Fast	F2	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S5	$3{,}16 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$3{,}2 \times 10^{-9}$
Fast	F3	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S5	$3{,}16 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$3{,}2 \times 10^{-9}$
Fast	G1	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S6	$1{,}00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-8}$
Fast	G2	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S6	$1{,}00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-8}$
Fast	G3	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S6	$1{,}00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-8}$
Fast	H1	1	Icke-radioaktiv E2	Fast	S7	$1{,}00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-7}$
Fast	H2	2	Icke-radioaktiv E2	Fast	S7	$1{,}00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-7}$
Fast	H3	3	Icke-radioaktiv E2	Fast	S7	$1{,}00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-7}$

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
Fast	A4	1	Noretynodrel	NE	WP1	$1{,}00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-9}$
Fast	A5	2	Noretynodrel	NE	WP1	$1{,}00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-9}$
Fast	A6	3	Noretynodrel	NE	WP1	$1{,}00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-9}$
Fast	B4	1	Noretynodrel	NE	WP2	$1{,}00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-8}$
Fast	B5	2	Noretynodrel	NE	WP2	$1{,}00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-8}$
Fast	B6	3	Noretynodrel	NE	WP2	$1{,}00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-8}$
Fast	C4	1	Noretynodrel	NE	WP3	$3{,}16 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$3{,}2 \times 10^{-8}$
Fast	C5	2	Noretynodrel	NE	WP3	$3{,}16 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$3{,}2 \times 10^{-8}$
Fast	C6	3	Noretynodrel	NE	WP3	$3{,}16 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$3{,}2 \times 10^{-8}$
Fast	D4	1	Noretynodrel	NE	WP4	$1{,}00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-7}$
Fast	D5	2	Noretynodrel	NE	WP4	$1{,}00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-7}$
Fast	D6	3	Noretynodrel	NE	WP4	$1{,}00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-7}$
Fast	E4	1	Noretynodrel	NE	WP5	$3{,}16 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$3{,}2 \times 10^{-7}$

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
Fast	E5	2	Noretynodrel	NE	WP5	$3{,}16 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$3{,}2 \times 10^{-7}$
Fast	E6	3	Noretynodrel	NE	WP5	$3{,}16 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$3{,}2 \times 10^{-7}$
Fast	F4	1	Noretynodrel	NE	WP6	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	F5	2	Noretynodrel	NE	WP6	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	F6	3	Noretynodrel	NE	WP6	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	G4	1	Noretynodrel	NE	WP7	$3{,}16 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$3{,}2 \times 10^{-6}$
Fast	G5	2	Noretynodrel	NE	WP7	$3{,}16 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$3{,}2 \times 10^{-6}$
Fast	G6	3	Noretynodrel	NE	WP7	$3{,}16 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$3{,}2 \times 10^{-6}$
Fast	H4	1	Noretynodrel	NE	WP8	$3{,}16 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$3{,}2 \times 10^{-5}$
Fast	H5	2	Noretynodrel	NE	WP8	$3{,}16 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$3{,}2 \times 10^{-5}$
Fast	H6	3	Noretynodrel	NE	WP8	$3{,}16 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$3{,}2 \times 10^{-5}$
Fast	A7	1	OTES	N	OTES1	$1{,}00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-10}$

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
Fast	A8	2	OTES	N	OTES1	$1{,}00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-10}$
Fast	A9	3	OTES	N	OTES1	$1{,}00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-10}$
Fast	B7	1	OTES	N	OTES2	$1{,}00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-9}$
Fast	B8	2	OTES	N	OTES2	$1{,}00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-9}$
Fast	B9	3	OTES	N	OTES2	$1{,}00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-9}$
Fast	C7	1	OTES	N	OTES3	$1{,}00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-8}$
Fast	C8	2	OTES	N	OTES3	$1{,}00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-8}$
Fast	C9	3	OTES	N	OTES3	$1{,}00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-8}$
Fast	D7	1	OTES	N	OTES4	$1{,}00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-7}$
Fast	D8	2	OTES	N	OTES4	$1{,}00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-7}$
Fast	D9	3	OTES	N	OTES4	$1{,}00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-7}$
Fast	E7	1	OTES	N	OTES5	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	E8	2	OTES	N	OTES5	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
Fast	E9	3	OTES	N	OTES5	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	F7	1	OTES	N	OTES6	$1{,}00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-5}$
Fast	F8	2	OTES	N	OTES6	$1{,}00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-5}$
Fast	F9	3	OTES	N	OTES6	$1{,}00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-5}$
Fast	G7	1	OTES	N	OTES7	$1{,}00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-4}$
Fast	G8	2	OTES	N	OTES7	$1{,}00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-4}$
Fast	G9	3	OTES	N	OTES7	$1{,}00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-4}$
Fast	H7	1	OTES	N	OTES8D-BP7	$1{,}00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-3}$
Fast	H8	2	OTES	N	OTES88	$1{,}00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-3}$
Fast	H9	3	OTES	N	OTES8	$1{,}00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-3}$
Fast	A10	1	Total bindning	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
Fast	A11	2	Total bindning	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
Fast	A12	3	Total bindning	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
Fast	B10	4	Total bindning	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
Fast	B11	5	Total bindning	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
Fast	B12	6	Total bindning	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
Fast	C10	1	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S1	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	C11	2	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S2	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	C12	3	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S3	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	D10	4	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S4	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	D11	5	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S5	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	D12	6	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S6	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
Fast	E10	1	Buffertkontroll	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
Fast	E11	2	Buffertkontroll	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
Fast	E12	3	Buffertkontroll	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
Fast	F10	4	Buffertkontroll	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
Fast	F11	5	Buffertkontroll	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
Fast	F12	6	Buffertkontroll	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
Fast	G10 (*)	1	Blankprov (för radioaktiv märkning)	Ra-dio-aktiv	H1	—	90	—	10	—	100	—

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
Fast	G11 (*)	2	Blankprov (för radioaktiv märkning)	Radioaktiv	H2	—	90	—	10	—	100	—
Fast	G12 (*)	3	Blankprov (för radioaktiv märkning)	Radioaktiv	H3	—	90	—	10	—	100	—
Fast	H10 (*)	4	Blankprov (för radioaktiv märkning)	Radioaktiv	H4	—	90	—	10	—	100	—
Fast	H11 (*)	5	Blankprov (för radioaktiv märkning)	Radioaktiv	H5	—	90	—	10	—	100	—
Fast	H12	6	Blankprov (för radioaktiv märkning)	Radioaktiv	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	Okänd 1	U1	1	$1{,}00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-10}$
P1	A2	2	Okänd 1	U1	1	$1{,}00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-10}$
P1	A3	3	Okänd 1	U1	1	$1{,}00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-10}$
P1	B1	1	Okänd 1	U1	2	$1{,}00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-9}$
P1	B2	2	Okänd 1	U1	2	$1{,}00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-9}$
P1	B3	3	Okänd 1	U1	2	$1{,}00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-9}$
P1	C1	1	Okänd 1	U1	3	$1{,}00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-8}$
P1	C2	2	Okänd 1	U1	3	$1{,}00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-8}$
P1	C3	3	Okänd 1	U1	3	$1{,}00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-8}$

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
P1	D1	1	Okänd 1	U1	4	$1{,}00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-7}$
P1	D2	2	Okänd 1	U1	4	$1{,}00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-7}$
P1	D3	3	Okänd 1	U1	4	$1{,}00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-7}$
P1	E1	1	Okänd 1	U1	5	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	E2	2	Okänd 1	U1	5	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	E3	3	Okänd 1	U1	5	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	F1	1	Okänd 1	U1	6	$1{,}00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-5}$
P1	F2	2	Okänd 1	U1	6	$1{,}00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-5}$
P1	F3	3	Okänd 1	U1	6	$1{,}00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-5}$
P1	G1	1	Okänd 1	U1	7	$1{,}00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-4}$
P1	G2	2	Okänd 1	U1	7	$1{,}00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-4}$
P1	G3	3	Okänd 1	U1	7	$1{,}00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-4}$
P1	H1	1	Okänd 1	U1	8	$1{,}00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-3}$
P1	H2	2	Okänd 1	U1	8	$1{,}00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-3}$
P1	H3	3	Okänd 1	U1	8	$1{,}00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-3}$

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
P1	A4	1	Okänd 2	U2	1	$1{,}00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-10}$
P1	A5	2	Okänd 2	U2	1	$1{,}00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-10}$
P1	A6	3	Okänd 2	U2	1	$1{,}00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-10}$
P1	B4	1	Okänd 2	U2	2	$1{,}00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-9}$
P1	B5	2	Okänd 2	U2	2	$1{,}00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-9}$
P1	B6	3	Okänd 2	U2	2	$1{,}00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-9}$
P1	C4	1	Okänd 2	U2	3	$1{,}00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-8}$
P1	C5	2	Okänd 2	U2	3	$1{,}00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-8}$
P1	C6	3	Okänd 2	U2	3	$1{,}00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-8}$
P1	D4	1	Okänd 2	U2	4	$1{,}00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-7}$
P1	D5	2	Okänd 2	U2	4	$1{,}00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-7}$
P1	D6	3	Okänd 2	U2	4	$1{,}00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-7}$
P1	E4	1	Okänd 2	U2	5	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
P1	E5	2	Okänd 2	U2	5	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	E6	3	Okänd 2	U2	5	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	F4	1	Okänd 2	U2	6	$1{,}00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-5}$
P1	F5	2	Okänd 2	U2	6	$1{,}00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-5}$
P1	F6	3	Okänd 2	U2	6	$1{,}00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-5}$
P1	G4	1	Okänd 2	U2	7	$1{,}00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-4}$
P1	G5	2	Okänd 2	U2	7	$1{,}00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-4}$
P1	G6	3	Okänd 2	U2	7	$1{,}00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-4}$
P1	H4	1	Okänd 2	U2	8	$1{,}00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-3}$
P1	H5	2	Okänd 2	U2	8	$1{,}00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-3}$
P1	H6	3	Okänd 2	U2	8	$1{,}00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-3}$
P1	A7	1	Okänd 3	U3	1	$1{,}00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-10}$
P1	A8	2	Okänd 3	U3	1	$1{,}00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-10}$
P1	A9	3	Okänd 3	U3	1	$1{,}00 \times 10^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-10}$
P1	B7	1	Okänd 3	U3	2	$1{,}00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-9}$

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
P1	B8	2	Okänd 3	U3	2	$1{,}00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-9}$
P1	B9	3	Okänd 3	U3	2	$1{,}00 \times 10^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-9}$
P1	C7	1	Okänd 3	U3	3	$1{,}00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-8}$
P1	C8	2	Okänd 3	U3	3	$1{,}00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-8}$
P1	C9	3	Okänd 3	U3	3	$1{,}00 \times 10^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-8}$
P1	D7	1	Okänd 3	U3	4	$1{,}00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-7}$
P1	D8	2	Okänd 3	U3	4	$1{,}00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-7}$
P1	D9	3	Okänd 3	U3	4	$1{,}00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-7}$
P1	E7	1	Okänd 3	U3	5	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	E8	2	Okänd 3	U3	5	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	E9	3	Okänd 3	U3	5	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	F7	1	Okänd 3	U3	6	$1{,}00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-5}$
P1	F8	2	Okänd 3	U3	6	$1{,}00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-5}$

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
P1	F9	3	Okänd 3	U3	6	$1{,}00 \times 10^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-5}$
P1	G7	1	Okänd 3	U3	7	$1{,}00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-4}$
P1	G8	2	Okänd 3	U3	7	$1{,}00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-4}$
P1	G9	3	Okänd 3	U3	7	$1{,}00 \times 10^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-4}$
P1	H7	1	Okänd 3	U3	8	$1{,}00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-3}$
P1	H8	2	Okänd 3	U3	8	$1{,}00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-3}$
P1	H9	3	Okänd 3	U3	8	$1{,}00 \times 10^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-3}$
P1	A10	1	Kontroll E2 (max)	Fast	E2max1	$1{,}00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}00 \times 10^{-7}$
P1	A11	2	Kontroll E2 (max)	Fast	E2max2	$1{,}00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}00 \times 10^{-7}$
P1	A12	3	Kontroll E2 (max)	Fast	E2max3	$1{,}00 \times 10^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}00 \times 10^{-7}$
P1	B10	1	Kontroll E2 (IC_{50})	Fast	$E2IC_{50}1$	$E2IC_{50} \times 10$	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	B11	2	Kontroll E2 (IC_{50})	Fast	$E2IC_{50}2$	$E2IC_{50} \times 10$	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	B12	3	Kontroll E2 (IC_{50})	Fast	$E2IC_{50}3$	$E2IC_{50} \times 10$	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	C10	1	Kontroll NE (max)	Fast	Nemax1	$1{,}00 \times 10^{-3{,}5}$	30	50	10	10	100	$1{,}00 \times 10^{-4{,}5}$

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
P1	C11	2	Kontroll NE (max)	Fast	Nemax2	$1{,}00 \times 10^{-3{,}5}$	30	50	10	10	100	$1{,}00 \times 10^{-4{,}5}$
P1	C12	3	Kontroll NE (max)	Fast	Nemax3	$1{,}00 \times 10^{-3{,}5}$	30	50	10	10	100	$1{,}00 \times 10^{-4{,}5}$
P1	D10	1	Kontroll NE (IC_{50})	Fast	$NEIC_{50}1$	$NEIC_{50} \times 10$	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	D11	2	Kontroll NE (IC_{50})	Fast	$NEIC_{50}2$	$NEIC_{50} \times 10$	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	D12	3	Kontroll NE (IC_{50})	Fast	$NEIC_{50}3$	$NEIC_{50} \times 10$	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	E10	1	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S1	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	E11	2	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S2	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	E12	3	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S3	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	F10	4	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S4	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	F11	5	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S5	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$
P1	F12	6	Icke-radioaktiv E2 (hög)	NSB	S6	$1{,}00 \times 10^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0 \times 10^{-6}$

Platta	Position	Replikat	Brunnstyp	Brunnskod	Koncentrationskod	Inledande koncentr. av konkurrerande ligand (M)	hrER-stamlösning (µl)	Buffertvolym (µl)	Volym spårsubstans (radioaktiv E2) (µl)	Volym från spädningsplatta (µl)	Slutvolym (µl)	Slutkoncentration av konkurrerande ligand (M)
P1	G10	1	Total bindning	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	Total bindning	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	Total bindning	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
P1	H10	4	Total bindning	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	Total bindning	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	Total bindning	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—

(*) Obs: brunnarna som märkts med ”radioaktiv” är tomma under inkubationen. Dessa 10 µl tillsätts endast i scintillationsräkningssyfte.

Tillägg 4

ÖVERVÄGANDEN INFÖR ANALYS AV DATA FRÅN KOMPETITIVT BINDNINGSTEST FÖR HRER

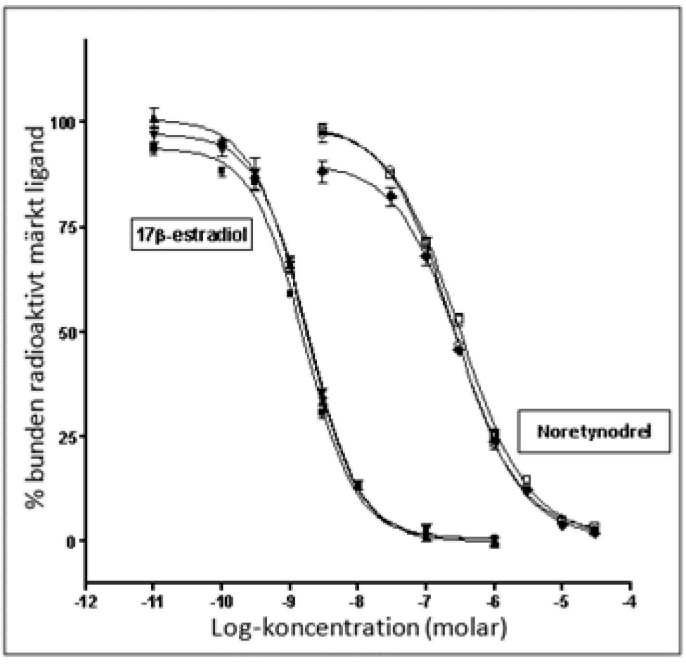
1. Det kompetitiva bindningstestet för hrERα mäter bindningen av [^{3}H]-17β-östradiol vid en viss koncentration i närvaro av ökande koncentrationer av en testkemikalie. Kurvan över kompetitiv bindning ritas som specifik [^{3}H]-17β-östradiol-bindning mot koncentrationen av konkurrerande ligand (log10-enheter). Den koncentration av testkemikalie som hämmar 50 % av den maximala specifika [^{3}H]-17β-östradiol-bindningen är IC_{50}.

Analys av data för referensöstrogen och svag bindare (1)

2. Data från kontrollomgångarna omvandlas (dvs. procentuell, specifik [^{3}H]-17β-östradiol-bindning och log-koncentrationen av kontrollkemikalien) för vidare analys. Uppskattningar av log(IC_{50})-värden för de positiva kontrollerna (t.ex. referensöstrogen och svag bindare) ska fastställas med hjälp av lämplig programvara för icke-linjär kurvanpassning så att de passar en fyraparameters Hill-ekvation (t.ex. BioSoft, GraphPad Prism) (2). Kurvans topp, botten, lutning och log(IC_{50})-värde kan i allmänhet lämnas utan restriktion (unconstrained) vid anpassning av dessa kurvor. Robust regression ska användas i fastställande av bästa anpassning, om inte annat val motiveras. Val av robust regressionsmetod ska anges. Korrigering av liganduttömning behövdes inte för FW- eller CERI-hrER-tester, men kan vid behov övervägas. Efter inledande analys ska varje bindningskurva granskas för att säkerställa korrekt anpassning till modellen. Den svaga bindarens relativa bindningsaffinitet (RBA) kan beräknas procentuellt som dess log(IC_{50})-värde i förhållande till log(IC_{50})-värdet för 17β-östradiol. Resultat för de positiva kontrollerna och den icke-bindande kontrollen bör utvärderas med mått på testprestanda och acceptanskriterier som beskrivits i denna testmetod (punkt 20), tillägg 2 (FW-test, punkterna 41–51) och tillägg 3 (CERI-test, punkterna 41–51). Exempel på 3 testomgångar för referensöstrogen och svag bindare visas i figur 1.

Figur 1

Exempel på kurvor över kompetitiv bindning för referensöstrogen och kontrollen med svag bindare



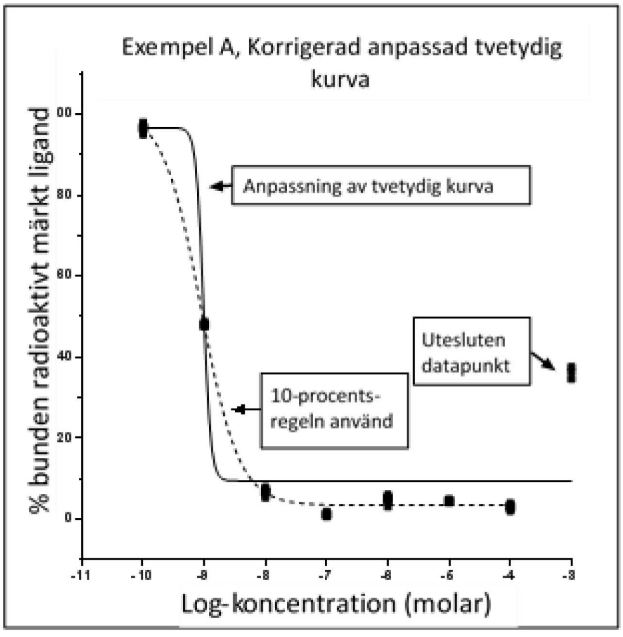
Dataanalys för testkemikalier

3. Data för alla testkemikalier ska analyseras med en stegvis strategi för att säkerställa att data analyseras korrekt och att varje kurva för kompetitiv bindning klassificeras korrekt. Det är lämpligt att en testkemikalies alla testomgångar initialt underkastas en standardiserad dataanalys som är identisk med den som använts för referensöstrogen och kontroller med svaga bindare. När den är klar bör en teknisk granskning av kurvanpassningsparametrarna göras, liksom en visuell granskning av hur väl data stämmer med den genererade kurvan över kompetitiv bindning, för varje testomgång. Under denna tekniska granskning är följande iakttagelser goda indikationer på att testet och dataanalyserna har genomförts korrekt: en koncentrationsberoende minskning i procentuell, specifikt bunden [^{3}H]-17β-östradiol, låg variation mellan de tekniska replikaten för varje kemisk koncentration och överensstämmelse mellan anpassningsparametrarna från de tre testomgångarna. Yrkesmässigt omdöme ska tillämpas vid granskning av resultaten från en testkemikalies alla testomgångar och de data som används för att klassificera respektive testkemikalie som bindare eller icke-bindare ska vara vetenskapligt försvarbara.

4. Emellanåt kan det finnas data som kräver ytterligare beaktande för att man ska kunna analysera och tolka hrER-bindningsdata korrekt. Olika studier har uppvisat fall där analys och tolkning av kompetitiva receptorbindningsdata kan kompliceras av en uppgång i procentuell specifik bindning när kemikalier testas vid sina högsta koncentrationer (figur 2). Detta är ett välkänt fenomen som har påträffats vid användning av protokoll för ett antal olika kompetitiva receptorbindningstester (3). I dessa fall observeras en koncentrationsberoende respons vid lägre koncentrationer, men när testkemikaliens koncentration närmar sig löslighetsgränsen minskar inte längre bortträngningen av [^{3}H]-17β-östradiol. I dessa fall indikerar data för de högre koncentrationerna att man har nått testets biologiska gräns. Till exempel är detta fenomen många gånger förknippat med kemisk olöslighet och utfällning vid höga koncentrationer, alternativ återspeglar det att man har överskridit det dextran-täckta träkolets förmåga att binda den icke-bundna, radioaktivt inmärkta liganden under separationssteget, vid den högsta kemiska koncentrationen. Att lämna kvar sådana datapunkter vid anpassning av kompetitiva bindningsdata till en sigmoidal kurva kan ibland leda till en felklassificering av testkemikaliens ER-bindningspotential (figur 2). För att undvika detta ingår det i FW- och CERI-hrER-bindningstesterna en möjlighet att från analyserna utesluta datapunkter där medelvärdet för replikaten när det gäller andelen specifikt bunden [^{3}H]-17β-östradiol är 10 % eller mer över det observerade medelvärdet vid en lägre koncentration (detta betecknas ofta som 10-procentsregeln). Denna regel kan endast användas en gång för varje enskild kurva, och det måste finnas kvar data från minst sex koncentrationer för att kurvan ska kunna klassificeras korrekt.

Figur 2

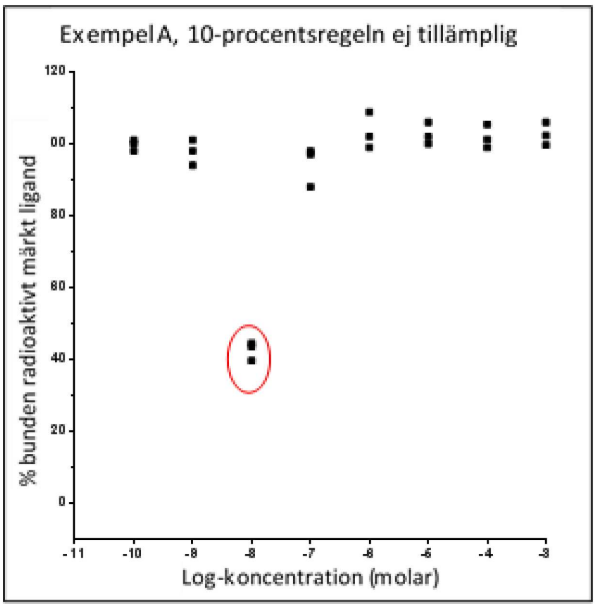
Exempel på kompetitiva bindningskurvor med och utan användning av 10-procentsregeln

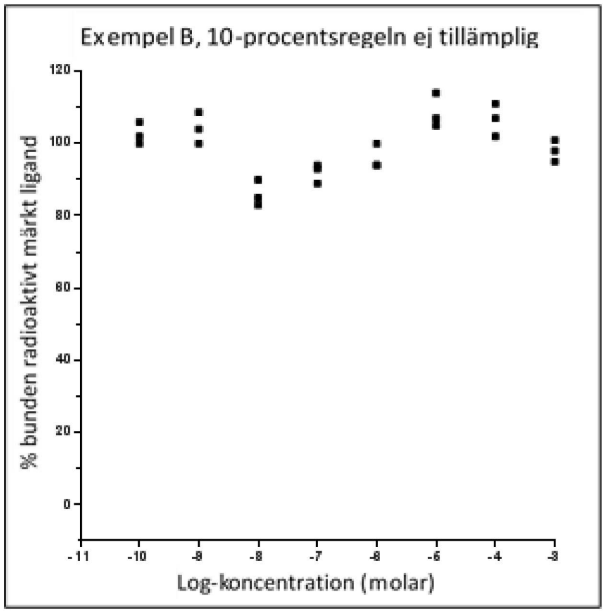


5. Lämplig användning av 10-procentsregeln för att korrigera dessa kurvor ska övervägas noga och förbehållas de fall där det finns starka indikationer på att ämnet är en hrER-bindare. I samband med utförande av experimenten för valideringsstudien av FW-hrER-bindningstestet noterade att 10-procentsregeln ibland ledde till en oavsiktlig och oförutsedd konsekvens. Kemikalier som inte interagerade med receptorn (dvs. faktiska icke-bindare) visade ofta en variation runt 100 % bunden radioaktivt märkt ligand som var större än 10 % över det testade koncentrationsintervallet. Om det lägsta värdet råkade vara vid en låg koncentration riskerade data från alla högre koncentrationer att uteslutas från analysen genom användning av 10-procentsregeln, även om dessa koncentrationer kunde vara användbara för att fastställa att kemikalien är en icke-bindare. Figur 3 visar exempel där det är olämpligt att använda 10-procentsregeln.

Figur 3

Exempel, kompetitiva bindningsdata där det är olämpligt att använda 10-procentsregeln





Litteratur

(1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.

(2) Motulsky H. och Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, I: Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, s. 187-191. Www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf

(3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.

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 cellytemarkörer, 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 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-SENS™ (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).

([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).

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 monocyter 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-1β 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 testas ([1]) 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). 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 ändamål ([2]). 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]) 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.

([2]) 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.

(3) Kapitel B.42 i denna bilaga: Hudsensibilisering: LLNA-metoden (Local Lymph Node Assay).

(4) Kapitel B.6 i denna bilaga: Hudsensibilisering.

(5) Kapitel B.50 i denna bilaga: Hudsensibilisering: LLNA-metoden (Local Lymph Node Assay): DA.

(6) Kapitel B.51 i denna bilaga: Hudsensibilisering: LLNA-metoden (Local Lymph Node Assay): BrdU-ELISA.

(7) Kapitel B.59 i denna bilaga: Hudsensibilisering in chemico: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA).

(8) Kapitel B.60 i denna bilaga: Hudsensibilisering in vitro: Testmetoden ARE-Nrf2-luciferas.

(9) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271-96.

(10) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. J Exp Med 180:1841-7.

(11) Aiba S, Terunuma A, Manome H and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. Eur J Immunol 27:3031-8.

(12) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y and Tagami H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and DNCB. J Invest Dermatol 120:390-8.

(13) 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.

(14) 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.

(15) 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 cellytemarkörer 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 cellytemarkörerna 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-enzymer) 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 % CO_2, 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 × 10^6 celler/ml. Cellernas densitet bör hållas mellan 0,1 och 1,0 × 10^6 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 ($NiSO_4$) (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 $NiSO_4$ 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 × 10^6 celler/ml eller 0,2 × 10^6 celler/ml, varefter de förodlas i odlingsflaskor under 72 timmar respektive 48 timmar. Det är viktigt att celldensiteten i odlingsflaskan direkt efter förodlingsperioden är så likartad som möjligt för varje experiment (genom användning av en av de båda förodlingsbetingelser som beskrivs ovan), eftersom celldensiteten i odlingsflaskan direkt efter förodlingen 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 × 10^6 celler/ml erhålls. Därefter fördelas cellerna i en flatbottnad 24-hålsplatta (500 µl per brunn, 1 × 10^6 celler/brunn) eller en flatbottnad 96-hålsplatta (80 µl per brunn, 1,6 × 10^5 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. Testkemikaliens 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 serieutspädningar 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 µg/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 µg/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 serieutspädningar 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 µg/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 µg/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 arbetslösningarna i punkt 15.

Applicering av testkemikalier och kontrollämnen

17. Odlingsmediet eller arbetslösningarna 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 ± 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 ± 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 µg/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.

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

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:

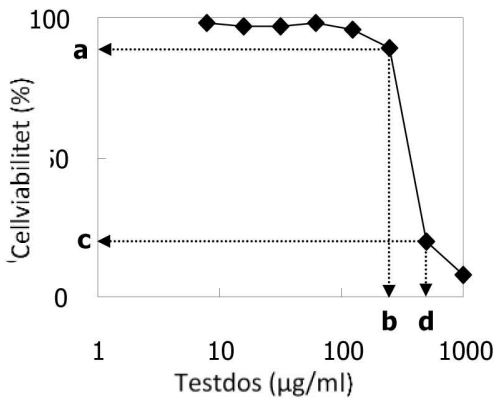
$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

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 kvalifikationsämnena).

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 × 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 × 1,2 × CV75 till 100 × 0,335 × CV75 [för saltlösning eller medium] eller från 500 × 1,2 × CV75 till 500 × 0,335 × 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 färska stamlösningar 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 ± 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 ± 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 rundbottnad 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 5556 57; 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:

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

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

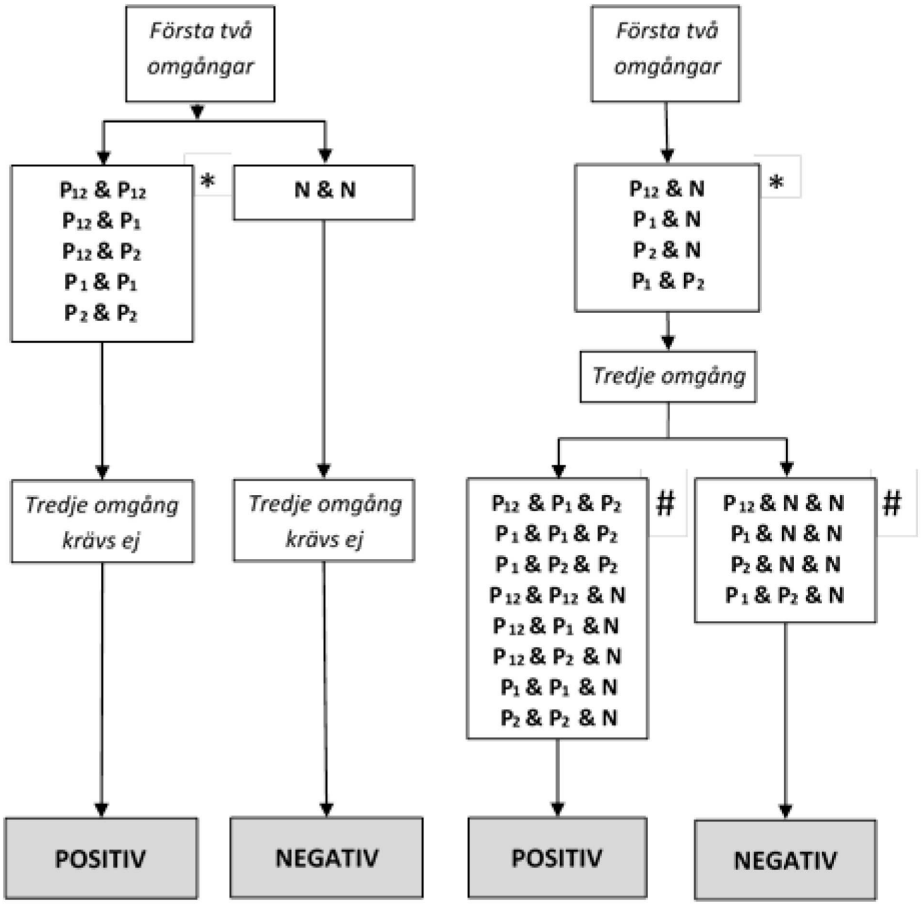
Prediktionsmodell

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.

P_1: testomgång med endast CD86 positiv, P_2: testomgång med endast CD54 positiv, P_{12}: 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:

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

$$EC\ 200\ (för\ CD86) = B_{konc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{konc} - B_{konc})]$$

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 × CV75 enligt den procedur för serieutspädning som beskrivs i punkt 20). Om cellviabiliteten vid 1,2 × CV75 är lika med eller högre än 90 % ska det negativa resultatet förkastas. När så är fallet rekommenderas det att man försöker förfina 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.

— Fysikaliskt tillstånd, 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.

— Fysikaliskt tillstånd, 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.

— Fysikaliskt tillstånd, 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.

— Fysikaliskt tillstånd, 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 erhölls).

— 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).

— 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 potencials. Regul Toxicol Parmacol. 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 Parmacol. 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 metabolizin 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 (6^{th} 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, Okamato 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

(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	Fysikaliskt tillstånd	In vivo-prediktion (1)	CV75, referensintervall 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-merkaptobensotiazol	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	> 5000	Negativt (> 5000)	Negativt (> 5000)
Glycerol	56-81-5	Flytande	Ej sensibiliserande	> 5000	Negativt (> 5000)	Negativt (> 5000)
Mjölksyra	50-21-5	Flytande	Ej sensibiliserande	1500–5000	Negativt (> 5000)	Negativt (> 5000)
4-aminobensoesyra	150-13-0	Fast	Ej sensibiliserande	> 1000	Negativt (> 1000)	Negativt (> 1000)

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 monocyter 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-SENS™-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-SENS™-testet på ett användbart sätt bidrar till identifieringen av risker för hudsensibilisering. De noggrannhetsvärden som anges här för U-SENS™-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-SENS™-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 [SNAr]) (1) (8) (9) (10). U-SENS™-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-enzymer) har kunnat predikteras korrekt med U-SENS™-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-SENS™-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-SENS™-testet inte är tillämpligt för andra specifika kategorier av testkemikalier, bör det inte användas för dessa specifika kategorier.

5. Som beskrivs ovan kan U-SENS™-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-SENS™-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-SENS™-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 molekyl 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 kvalifikationsämnen 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-SENS™ DB-ALM-protokoll (DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation) nr 183 (12). Standardförfaranden (SOP, Standard Operating Procedures) bör användas när U-SENS™-testet införs och används i laboratoriet. Ett automatiserat system för genomförande av U-SENS™-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-SENS™-testet.

Förberedelse av celler

10. Den humana cellinjen U937 (med ursprung i histiocytiskt lymfom) (13) ska användas vid utförandet av U-SENS™-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 % CO_2, i RPMI-1 640-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 2 508-19-2, ≥ 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 förodlas i odlingsflaskor under två dygn respektive ett dygn. Andra förodlingsförhållanden 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 kontrollämnen

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, ≥ 99 % renhet) som sekundärt lösningsmedels-/vehikelalternativ om testkemikalien inte är löslig i lösningsmedlet/vehikeln komplett medium. För själva testet löses testkemikalien till en slutlig koncentration på 0,4 mg/ml i komplett medium, om kemikalien är löslig i detta lösningsmedel/denna vehikel. Om kemikalien endast är löslig 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 i komplett medium) (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), lösningsmedels-/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 % CO_2. 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 µl iskall fosfatbuffrad saltlösning (PBS, Phosphate Buffered Saline) som innehåller 5 % fetalt kalvserum (infärgningsbuffert). Efter centrifugeringen resuspenderas cellerna med 100 µl infärgningsbuffert och färgas med 5 µl (till exempel 0,25 µg) 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 5556 57, klon: Fun-1, eller Caltag/Invitrogen nr MHCD8601, klon: BU63; och för IgG1: BD-PharMingen nr 5557 48 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 kvalifikationsämnena i tillägg 2.2. Efter två tvättar med 100 µl infärgningsbuffert och en tvätt med 100 µl iskall PBS resuspenderas cellerna i iskall PBS (till exempel 125 µl för prover som ska analyseras manuellt rör för rör eller 50 µl vid användning av en autosampler-platta) och PI-lösning tillsätts (med en slutlig koncentration på 3 µg/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 kvalifikationsämnena 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 målantal 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.

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

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:.

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

% $IgG1^{+}$ obehandlade kontrollceller: avser procentandelen FL1-positiva IgG1-celler som definierats med analysmarkören (godkänt intervall ≥ 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-SENS™-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:

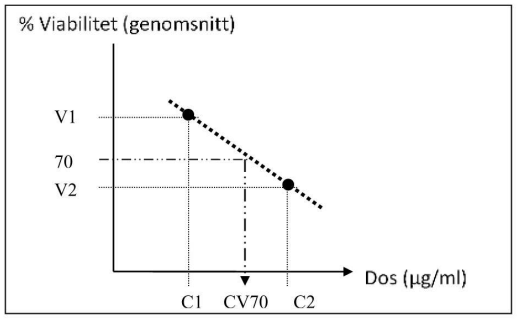
CV70 = C1 + [(V1 – 70) / (V1 – V2) × (C2 – C1)]

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).

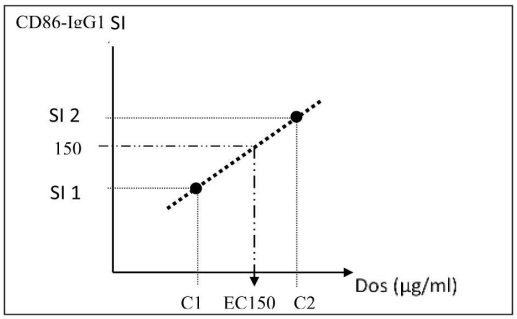
EC150-värdet beräknas genom log-linjär interpolering med användning av följande formel:

EC150 = C1 + [(150 – SI 1) / (SI 2 – SI 1) × (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

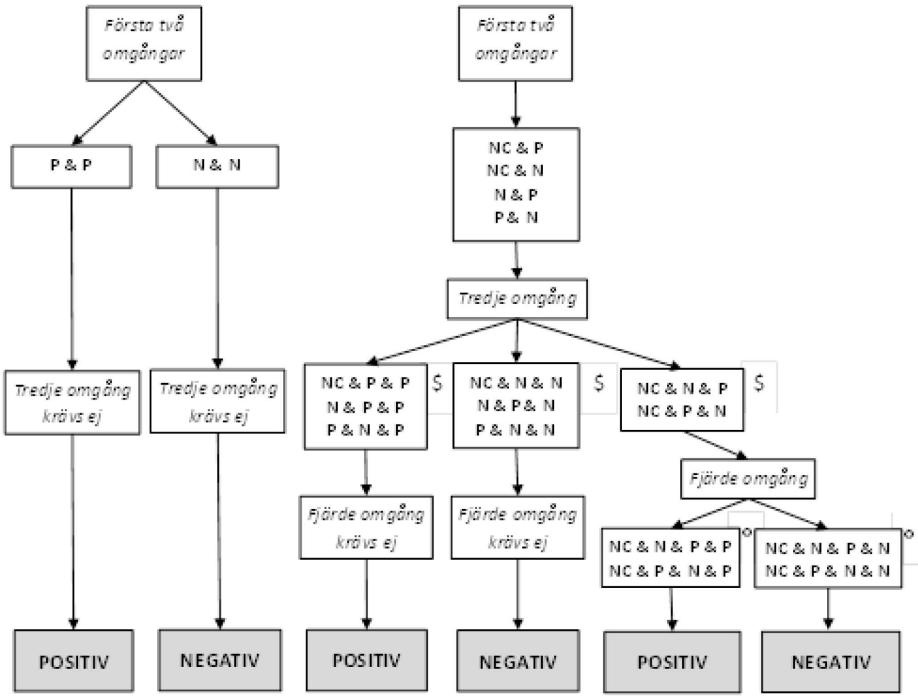
21. För mätningen av CD86-uttryck testas varje testkemikalie i minst fyra koncentrationer och i minst två oberoende testomgångar (som utförs på olika dagar) för att få fram en enda prediktion (NEGATIV eller POSITIV).

— Det enskilda resultatet för en U-SENS™-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-SENS™-testomgång vara positivt (nedan kallat *P*).

— En U-SENS™-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-SENS™-prediktionen vara NEGATIV och någon tredje testomgång behöver inte utföras.

— En U-SENS™-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-SENS™-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-SENS™-testet. En U-SENS™-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-SENS™-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 ≥ 2 % och ≤ 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 ≥ 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 ≥ 70 %).

— Den positiva kontrollen (TNBS) anses giltig om åtminstone två av de tre replikaten är positiva (CD86 SI ≥ 150 %) och icke-cytotoxiska (cellviabilitet ≥ 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.

— Fysikaliskt tillstånd, 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.

— Fysikaliskt tillstånd, 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.

— Fysikaliskt tillstånd, 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.

— Fysikaliskt tillstånd, 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 erhölls).

— 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-SENS™-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 28 178 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 28 553 EN; doi 10.2760/588955. Finns på https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing.

(5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 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., Kuehnl, 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 metabolizin 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-SENS™), 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 ≥ 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 kontrollreplikatet 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 kontrollreplikatet 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 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, 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-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 (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-SENS™-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 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 U-SENS™-testet. Det finns dessutom publicerade referensdata att tillgå för U-SENS™-testet (1) (8).

Tabell 1

Rekommenderade ämnen för att påvisa teknisk kompetens i fråga om U-SENS™-testet

Kvalifikationsämne	CAS-nr	Fysikaliskt tillstånd	In vivo-prediktion [1]	U-SENS Lösningsmedel/vehikel	U-SENS CV70-referensintervall i µg/ml [2]	U-SENS EC150-referensintervall 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] Komplett medium: RPMI-1640-medium kompletterat med 10 % fetalt kalvserum, 2 mM L-glutamin, 100 enheter/ml penicillin och100 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 fytoöstrogenkoncentrationer 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 fytoöstrogenliknande 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, λmax = 580 nm) (12) för IL-8-promotorns genuttryck och ett luciferasenzym som sänder ut rött ljus (SLR, λmax = 630 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 (≥ 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 förodlas 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 kontrollämnen

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 15000 varv per minut (≈ 20000 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 × 1/X. För testomgångarna två till fyra bereds en andra stamlösning med koncentrationen 4 × 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 % CO_2, varefter luciferasaktiviteten mäts enligt beskrivningen nedan.

21. Lösningsmedelskontrollen 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 20000 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 CO_2-inkubator under 16 timmar (37 °C, 5 % CO_2), 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 CO_2-inkubator under 16 timmar (37 °C, 5 % CO_2), 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 färska 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 förvärmt 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 ±SD (standardavvikelse) för IL8LA, genomsnittlig ±SD för GAPLA, genomsnittlig ±SD för nIL8LA, genomsnittlig ±SD för Ind-IL8LA, genomsnittlig ±SD för Inh-GAPLA och det 95-procentiga konfidensintervallet för Ind-IL8LA. Definitioner av parametrarna som används i denna punkt finns i tilläggen 3.1 och 3.4.

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 ≥ 1,4 och den nedre gränsen för det 95-procentiga konfidensintervallet för Ind-IL8LA är ≥ 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).

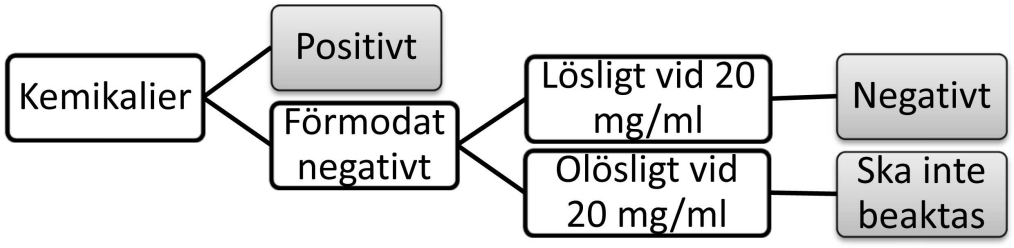
Tabell 2

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	Förmodat negativt
Negativt	Positivt	Positivt	—	Positivt
		Negativt	Positivt	Positivt
			Negativt	Förmodat negativt
	Negativt	Positivt	Positivt	Positivt
			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.

— Fysikaliskt tillstånd, 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.

— Fysikaliskt tillstånd, 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.

— Fysikaliskt tillstånd, 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.

— Fysikaliskt tillstånd, 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 erhölls).

— 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 and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci 124:359-69.

(2) 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 and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol 69:371-9.

(6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. Toxicol *In Vitro* 29:1816-30.

(7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F 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 and Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

(9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016). Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.

(10) Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.

(11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

(12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.

(13) Viviani VR, Bechara EJ and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.

(14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.

(15) OECD (2017). 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 and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046-9.

(20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: 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 (λmax = 630 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 (λmax = 580 nm) som styrs av IL-8-promotorn.

Ind-IL8LA: Induktionsförhållande för nIL8LA. 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-luciferas-aktiviteten 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-/vehikel-kontroll 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 vätmedel. (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 flerfärgsdetektorsystem 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 (λmax = 580 nm) och SLR (λmax = 630 nm).

För att fastställa transmissionskoefficienterna för långpassfiltret på 600 nm behöver man, med användning av renade SLO- och SLR-luciferasenzymer, i) mäta SLO- och SLR-bioluminiscensens intensitet utan filter (F0), ii) mäta SLO- och SLR-bioluminiscensens intensitet 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.

Transmission coefficients		Abbreviation	Definition
SLO	Filter 1 Transmission coefficients	$=\kappa O_{R60}$	The filter's transmission coefficient for the SLO
SLR	Filter 1 Transmission coefficients	κR_{R60}	The filter's transmission coefficient for the 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:

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

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:

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

Material och metoder för att fastställa transmissionsfaktorer

1) Reagenser

Enkla renade luciferasenzymer:

Frystorkat renat SLO-enzym

Frystorkat renat SLR-enzym

(som för valideringsarbetet erhölls 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 alikvoter om 10 µl i engångsprovrör 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 bioluminiscens

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 förvärmd 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:

Transmissionskoefficient (SLO [κO_{R60}]) = (#B1 vid F1 + #B2 vid F1 + #B3 vid F1) / (#B1 vid F0 + #B2 vid F0 + #B3 vid F0)

Transmissionskoefficient (SLR [κO_{R60}]) = (#D1 vid F1 + #D2 vid F1 + #D3 vid F1) / (#D1 vid F0 + #D2 vid F0 + #D3 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 nio ämnen som rekommenderas i tabell 1 och genom att erhålla värden som håller sig inom respektive referensintervall för minst åtta av de nio 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-merkaptobensotiazol	149-30-4	Fast	Olösligt	Sensibiliserande (måttligt)	Positiv	250–29-0	60–250
Etylendiamin	107-15-3	Flytande	Lösligt	Sensibiliserande (måttligt)	Positiv	500–70-0	0,1–0,4
Etylenglykoldimetakrylat	97-90-5	Flytande	Olösligt	Sensibiliserande (svagt)	Positiv	> 2000	0,04–0,1
4-allylanisol (Estragol)	140-67-0	Flytande	Olösligt	Sensibiliserande (svagt)	Positiv	> 2000	0,01–0,0-7
Streptomycinsulfat	3810-74-0	Fast	Lösligt	Ej sensibiliserande	Negativ	> 2000	> 2000
Glycerol	56-81-5	Flytande	Lösligt	Ej sensibiliserande	Negativ	> 2000	> 2000
Isopropanol	67-63-0	Flytande	Lösligt	Ej sensibiliserande	Negativ	> 2000	> 2000

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) CV_{05} och IL-8 Luc MIT har beräknats med användning av den vattenlöslighet som anges av EPI Suite™.
(4) CV_{05}: 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:

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

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 .

$$A = \overline{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \overline{x} \times \overline{y}$$

$C = \overline{y}_i^2 - t_{0.975(\nu)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}$, and $n_0 = 4$

$\overline{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$

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

$n_{yi} = 4$

$\overline{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \overline{y}_i)^2$

är den 97,5:e percentilen för den centrala t-fördelningen med frihetsgraden ν, där

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

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:

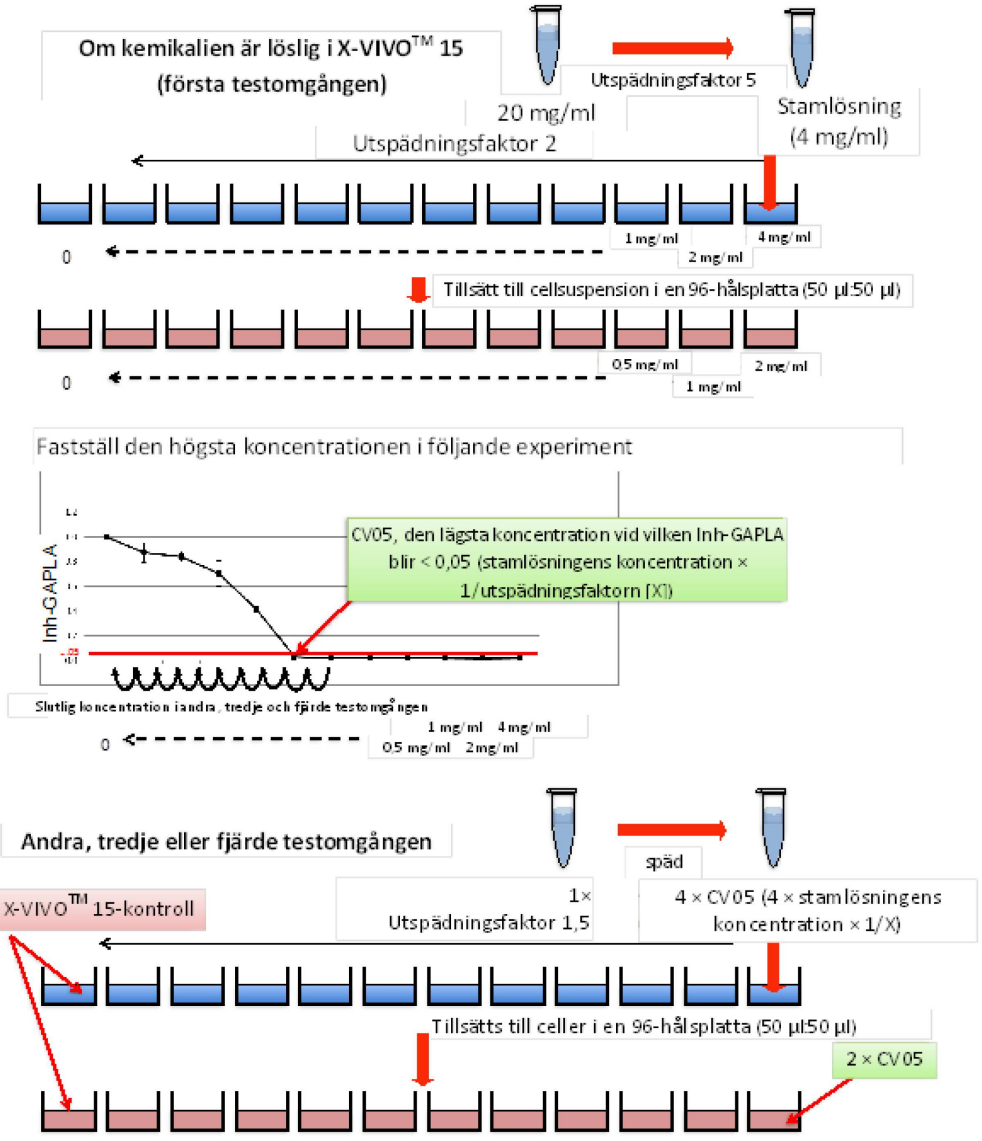
$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

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.

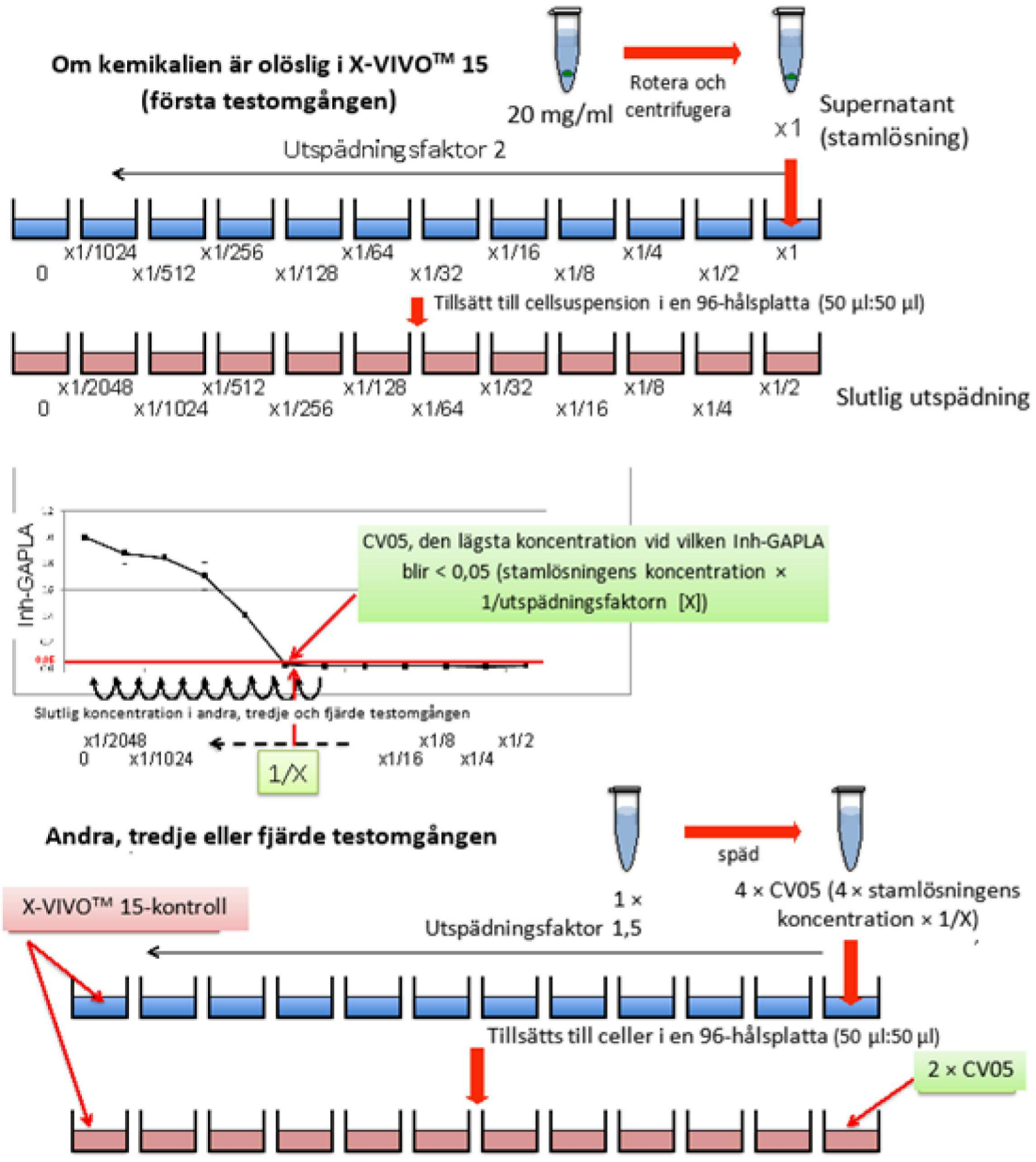
Tillägg 3.5

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

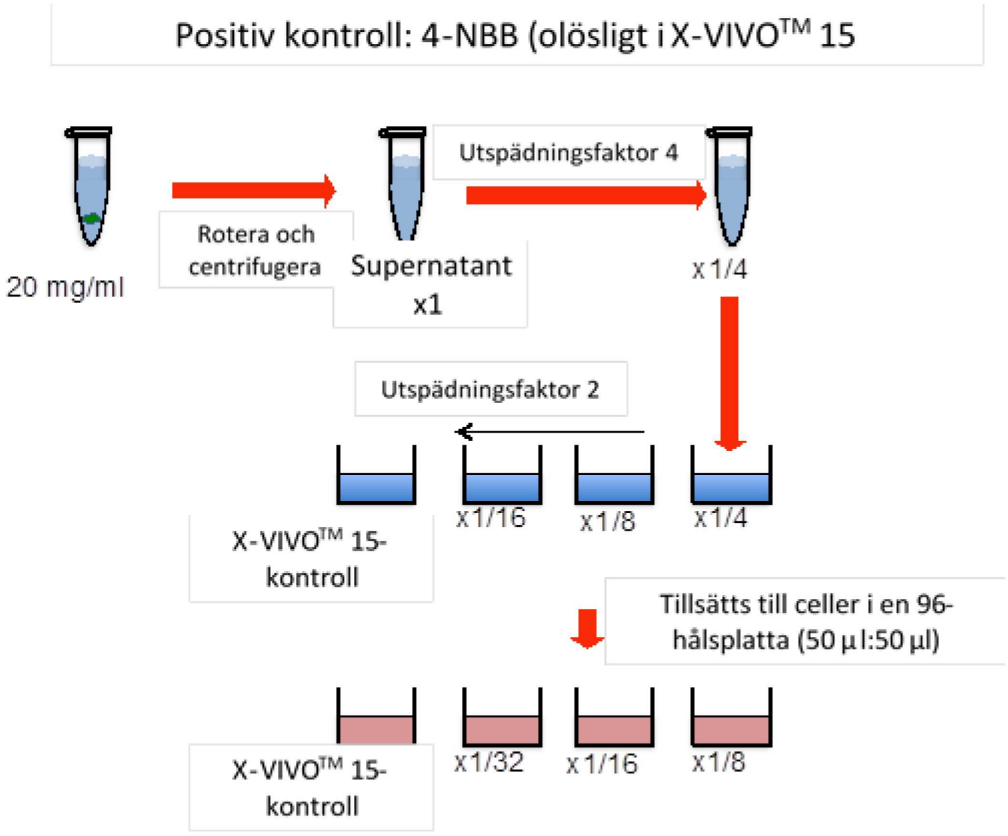


b) För kemikalier som är olösliga i X-VIVO™ 15 vid koncentrationen 20 mg/ml



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 (ECx, Effect Concentration), även om det bör noteras att ECx-strategier sällan lämpar sig för stora studier av den här typen där en ökning av antalet testkoncentrationer för att möjliggöra ett fastställande av önskat ECx-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 enstaka 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 könsmogna 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 ± 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 (~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 testresultatens 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 ± 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 ± 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 volymetriskt 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 endpoint-värdena (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 icke-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 ± 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 (nolleffekt-koncentration), vilka krävs för riskbedömning enligt vissa regelverk eller i vissa jurisdiktioner. Generellt sett ska avståndsfaktorn mellan nominella koncentrationer av testkemikalien för intilliggande behandlingsnivåer vara ≤ 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 replikatkammare 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 ± 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 testkärlen vid behov, till exempel genom omsorgsfull rengöring av varje akvariums botten med hjälp av en hävert. Dessutom bör sidorna och bottnen på varje akvarium rengöras en eller två gånger i veckan (till exempel genom skrapning med en spatel). Ett exempel på ett utfodringsschema 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 kemikaliens 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 ± 20 % av de genomsnittliga uppmätta koncentrationsvärdena 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, och 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 $NaHCO_3$ (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 inkubationskamrarna.

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. Inkubationskamrarna 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 avlivas 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 miljövårdsmyndighet (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 fenstrålar på analfenan som en sekundär könskaraktär, 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 sugs 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				
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

- 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

DATA OCH RAPPORTERING

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 nolleffektkoncentration (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 upprepad 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:

— Fysikaliskt tillstånd, 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 testkärlen, samt den metod med vilken dessa erhölls och bevis för att mätningarna hänför 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 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 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.

(2) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. Current Protocols in Toxicology 39: 1–36.

(3) 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.

(4) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. Water Research 16: 457–464.

(5) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 19: 1925–1930.

(6) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552–2560.

(7) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17β-Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Chemosphere 47: 71–80.

(8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 21: 1692–1698.

(9) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-*Tert*-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1487–1496.

(10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. Aquatic Toxicology 79: 288–295.

(11) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. Aquatic Toxicology 77: 78–86.

(12) Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Journal of Applied Toxicology 35:11–23.

(13) U.S. 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.

(14) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. Chemosphere 86: 593–599.

(15) 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.

(16) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

(17) Denny JS, Spehar RL, Mead KE och Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.

(18) 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.

(19) Kinoshita M, Murata K, Naruse K och Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley-Blackwell.

(20) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety 54: 330–338.

(21) Kapitel C.15 i denna bilaga, Fisk, korttidstest avseende toxicitet på embryo− och säckyngelstadierna.

(22) Kapitel C.37 i denna bilaga, 21-dagars test på fisk: En kortsiktig screening för ämnen med östrogen och androgen aktivitet samt aromatashämmande verkan.

(23) Kapitel C.41 i denna bilaga, Test på fiskars könsutveckling.

(24) Kapitel C.48 i denna bilaga, Korttidstest av reproduktion hos fisk.

(25) Kapitel C.47 i denna bilaga, Toxicitetstest på fisk i tidiga levnadsstadier.

(26) Kapitel C.49 i denna bilaga, Akut toxicitetstest på fiskembryo (FET).

(27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L och Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. Chemosphere 92: 1067–1076.

(28) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301–308.

(29) 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.

(30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. Genetics 163: 245–251.

(31) Shinomiya A, Otake H, Togashi K, Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, Zoological Science 21: 613–619.

(32) 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.

(33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and 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 nosspetsen 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.

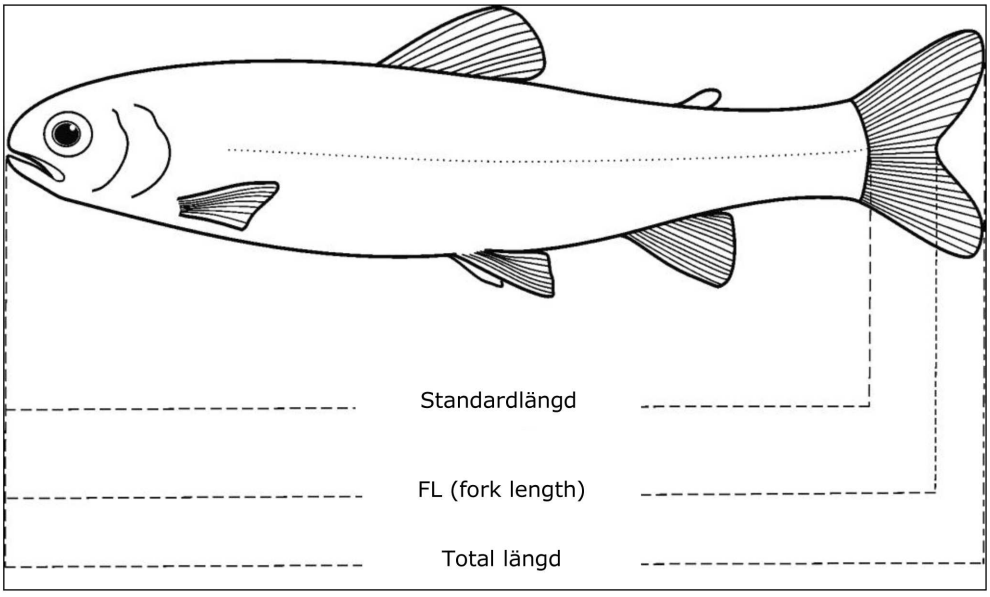
IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee.

Standardlängd (SL): längd från nosspetsen 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 nosspetsen 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



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.

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 (*Oryzias latipes*).
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).
5. Fotoperiod	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, *Artemia* spp., (24 timmar gamla naupliuslarver) med fri tillgång (*ad libitum*), kompletterat med ett kommersiellt tillgängligt flingfoder vid behov. (Ett exempel på ett utfodringsschema 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, *vtg*-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 1000 till 2000, 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 fenstrålarna 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 torrvikt 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 torrvikt havskräfta utfodras.

Tabell 1

Exempel på ett utfodringsschema

Tid (efter kläckning)	Havskräfta (mg torrvikt/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

Tid (efter kläckning)	Havskräfta (mg torrvikt/fisk/dygn)
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

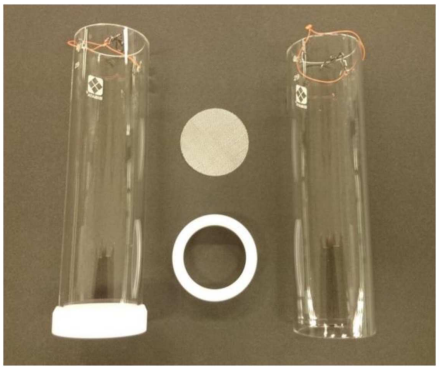
Exempel A





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 bottnen, 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





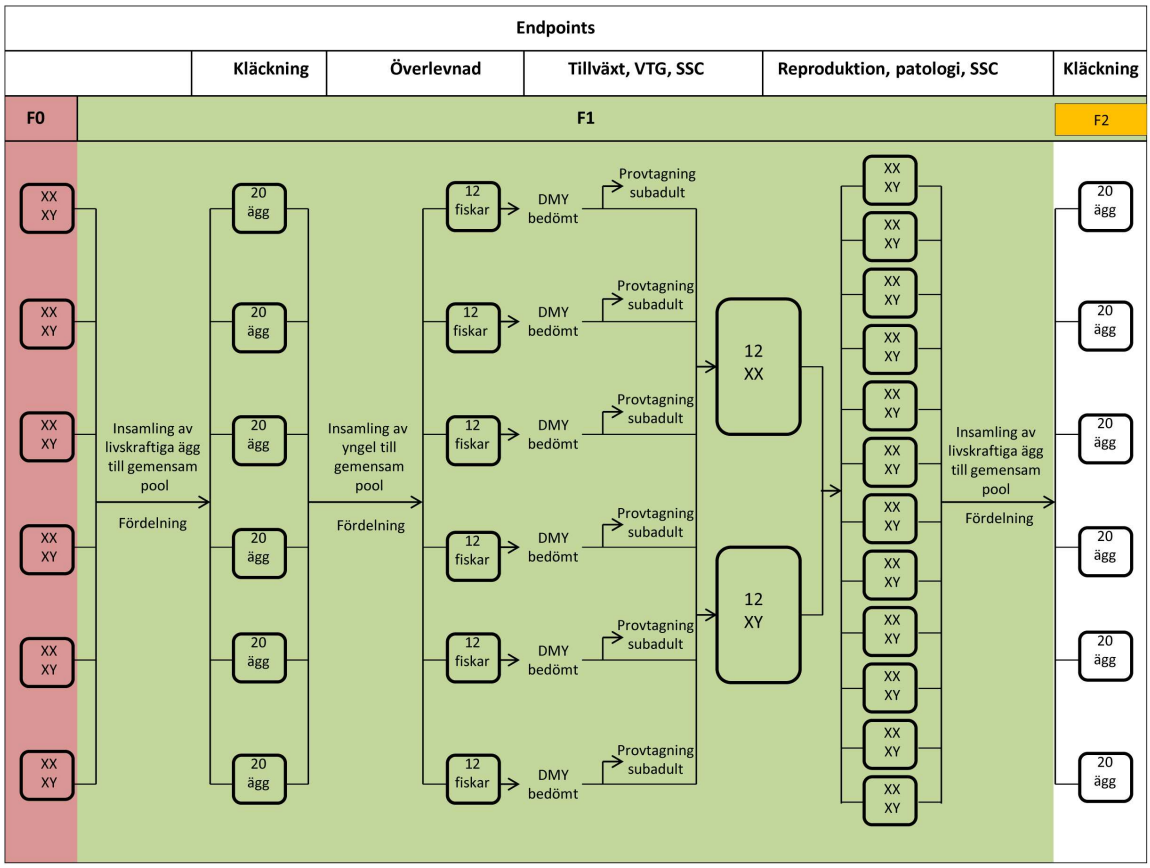
Den här inkubatorn består av en glascylinder (med 5 cm diameter och 10 cm höjd) och ett nät i rostfritt stål (0,25 φ och meshstorlek 32) som är fäst mot cylinderns botten med en PTFE-ring. Inkubatorerna hänger från lyftstången ned i akvarier och skakas vertikalt (med en amplitud på cirka 5 cm) i en lämplig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

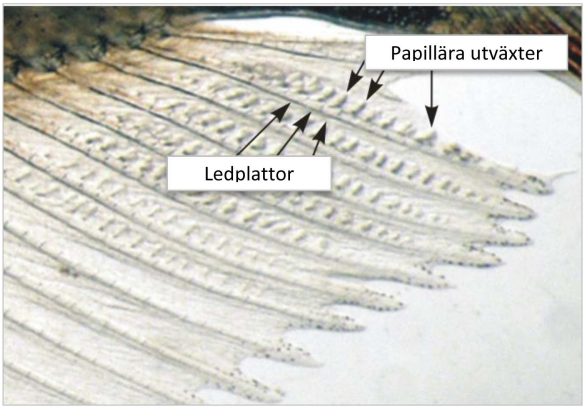
— Fixativ (till exempel Davidsons fixativ [Bouins fixativ rekommenderades inte]), om man inte väljer att räkna från en bild

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. Fiskkroppen 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 (befruktning) 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 ogenomskinligt 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 ynglen 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 fiskynglen 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 stjärtfenan 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 subadulta 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) avlivas F1-avelsparen på ett skonsamt sätt och analyseras med avseende på endpoint-värdena 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 Cochrane-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 text 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 = Tid*Tid+Behandling + *Behandling + Tid*Behandling + *Tid*Behandling, med slumpmässiga effekter för Replikat(Generation*Behandling) och Tid*Replikat(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 kvadratiska kontraster. Om data är monotona rekommenderas ett Jonckheere-Terpstra-test för trender inom replikats medianvärden (enligt rekommendationerna i OECD 2006). Om den kvadratiska 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.

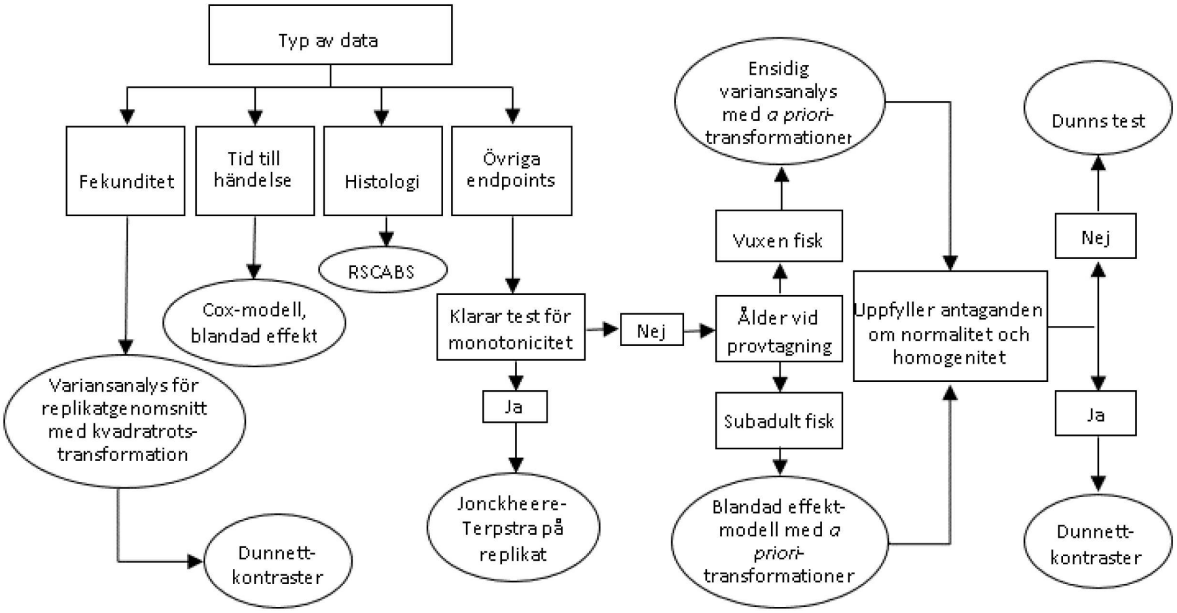
För vikt och längd rekommenderas inga transformationer, även om sådana då och då kan behövas. Det rekommenderas dock att man gör en logaritmisk transformation för vitellogenin-data, en kvadratrotstransformation för SSC-data (papillära utväxter på analfenan) och en arcussinus-kvadratrotstransformation 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 kläckts 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 and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

(3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, Kalifornien: Brooks/Cole.

(4) Hochberg Y and 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 miljövårdsmyndighet 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 kännetecknа 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 × % förändring (ECx, Effect Concentration) för den uppmätta endpointen. Det bör dock noteras att ECx-strategier sällan lämpar sig för stora studier av den här typen, där en ökning av antalet testkoncentrationer för att möjliggöra ett fastställande av önskat ECx-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 utröna 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 bifenyler) (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 kännetecka 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 ± 0,2 g respektive 11,5 ± 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. Jodinnehållet kan, förutom i spädvattnet, även mätas i fodret (fodren).

Exponeringssystem

18. Testet har tagits fram med användning av ett utspädningssystem 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. Flödeshastigheten till varje akvarium ska vara konstant, med tanke på såväl bevarandet av de biologiska betingelserna som den kemiska exponeringen. Det rekommenderas att använda lämpliga flödeshastigheter (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. Flödeshastigheten för stamlösningen ska kalibreras utifrån en analytisk bekräftelse av testlösningarnas koncentration innan exponeringen påbörjas, samt kontrolleras volymetriskt 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 hjälplösningsmedel, 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 ”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 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. 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 allvarligare 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 ± 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 ± 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 replikatakvarium 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 ± 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 80–120 % 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 testkärlen, 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

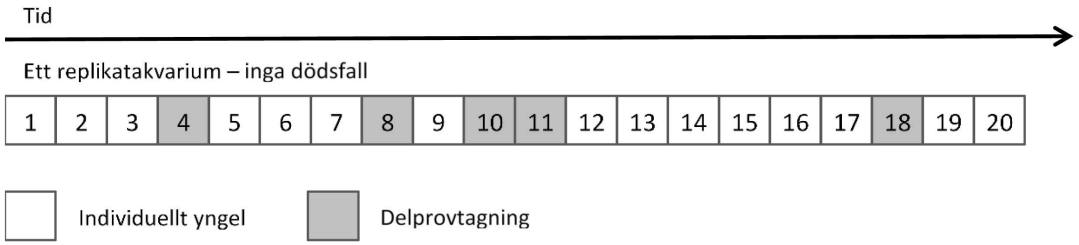
Kortfattad beskrivning av delprovtagningen på yngel

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)

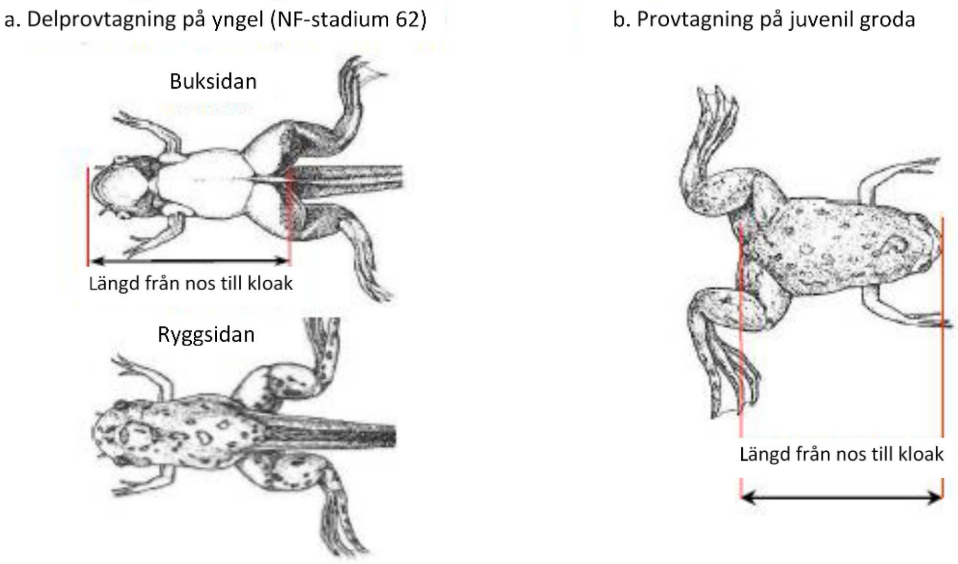
45. Mätningar av våtvikt (närmaste mg) och längd från nos till kloak (SVL, snout-to-vent length) (närmaste 0,1 mm) för varje grodyngel ska utföras omedelbart efter att djuret blir icke-responsivt av bedövningen (figur 2a). Programvara för bildanalys kan användas för att mäta SVL från ett fotografi. Grodyngel 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 (buksidan). Bilderna är hämtade från Nieuwkoop och Faber (1994) och anpassade.

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.

DATA OCH RAPPORTERING

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 ECx-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:

Fysikaliskt tillstånd, 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 skolios 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 erhölls och bevis för att mätningarna hänför 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).

— Nolleffektkoncentrationen (NOEC) för varje bedömd respons.

— Lägsta koncentration med observerad effekt (LOEC) för varje bedömd respons (vid $\alpha = 0{,}05$), ECx 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) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.

(2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150), Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.

(3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, Förenta staterna.

(4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 16–27.

(5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140–144.

(6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.

(7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281–285.

(8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335–340.

(9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.

(10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143–150.

(11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469–2474.

(12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117–123.

(13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441–448.

(14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321–327.

(15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159–169.

(16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, Förenta staterna.

(17) Kapitel C.4 i denna bilaga, Bestämning av ”lätt” bionedbrytbarhet.

(18) Kapitel C.29 i denna bilaga, Lätt bionedbrytbarhet – CO_2 i förslutna kärl (Headspace-test).

(19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539–551.

(20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593–599.

(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 and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

(23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, 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 and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415–424.

(31) Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.

(32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), 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: hypotalamus-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	*Xenopus laevis*
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 600–2000 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 *Xenopus laevis* (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 ≥ 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 sköldkörtelns 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 ± 0,2 g respektive 11,5 ± 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 erhålla 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 hälls av och kasseras, varpå kräftorna hälls 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) 1 ml (från och med dag 16)	0,5 ml (från dag 8 till dag 15) 1 ml (från och med dag 16)
Vecka 2	0,67 ml	2,4 ml		
Vecka 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Vecka 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml

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)
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.

Utfodringsschema

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 viktmätningen.

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)	Krossade pelletar (mg per juvenil groda)	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 69 506) eller någon liknande produkt, i enlighet med produktens instruktioner. DNA kan elueras från spinnkolonnerna 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

Mastermix	1x (µl)	[Slutlig]
JumpStart™ *Taq*	0,4	0,05 enheter/µl
DNA-mall	1,0	~200 pg/µl

(*) Nukleasfritt vatten
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.

Agarosgel-elektrofores (3 %) (provprotokoll)

50X TAE

Tris	24,2 g
Isättika	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Tillsätt vatten till 100 ml

1X TAE

H_2O	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. Rotera 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). Rotera 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 personalen ([1]).

4. Häll gelen i en form med kam. Låt svalna helt.

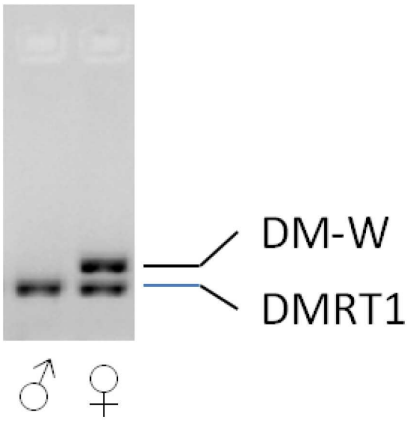
5. Tillsätt gel till apparaten. Täck gelen med 1X TAE.

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.

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 and Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469–2474.

([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).

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 > 20000 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_2CO_3	0,68 g
Vatten	428 ml

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

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	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 vakuum-centrifug [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 engångsprovrör 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/B_o 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 alikvoter och förvaras vid −80 °C. För varje platta tinas en alikvot 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 1:2000 (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. B_o-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, B_o 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/B_o

Subtrahera det genomsnittliga NSB-värdet från alla mätresultat. B/B_o för varje prov och standardlösning beräknas genom att absorptionsvärdet (B) divideras med den genomsnittliga absorptionen för B_o-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/B_o-värde utifrån B/B_o-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 (B_0) 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 konfidensintervallen 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 kvadratiska 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-kvadratrotstransformation. 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

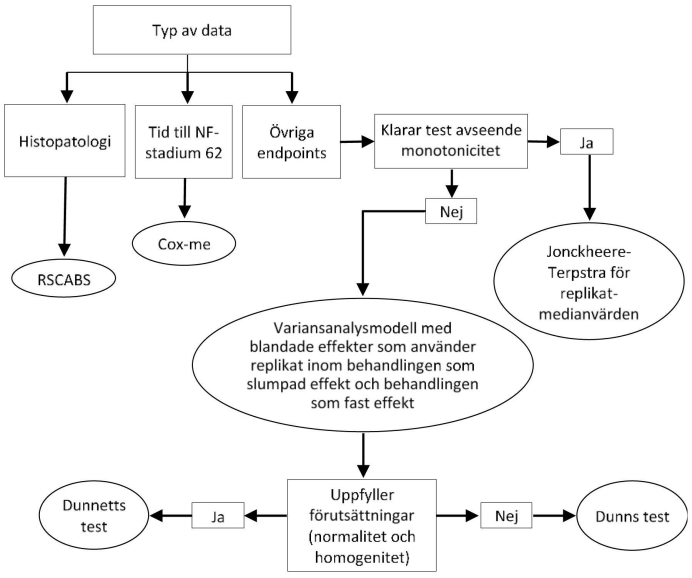
Data gällande tiden till metamorfos ska behandlas som tid-till-händelse-data, med eventuella dödsfall eller individer som inte uppnår NF-stadium 62 inom 70 dygn behandlade som höger-censurerade data (det vill säga det verkliga värdet är högre än 70 dygn, men studien avslutas efter 70 dygn innan djuren 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, 1 108–1 116.

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 miljövårdsmyndighet 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 and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. Science of the Total Environment 392: 110–118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185–198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively 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 and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445–453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraez and P. Herraez. 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.”