

II

(Ikke-lovgivningsmæssige retsakter)

FORORDNINGER

KOMMISSIONENS FORORDNING (EU) 2017/735

af 14. februar 2017

om ændring med henblik på tilpasning til den tekniske udvikling af bilaget til forordning (EF) nr. 440/2008 om fastlæggelse af forsøgsmetoder i henhold til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH)

(EØS-relevant tekst)

EUROPA-KOMMISSIONEN HAR —

under henvisning til traktaten om Den Europæiske Unions funktionsmåde,

under henvisning til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 af 18. december 2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og ophævelse af Rådets forordning (EØF) nr. 793/93 og Kommissionens forordning (EF) nr. 1488/94 samt Rådets direktiv 76/769/EØF og Kommissionens direktiv 91/155/EØF, 93/67/EØF, 93/105/EF og 2000/21/EF ⁽¹⁾, særlig artikel 13, stk. 2, og

ud fra følgende betragtninger:

- (1) Kommissionens forordning (EF) nr. 440/2008 ⁽²⁾ indeholder de forsøgsmetoder, der skal anvendes til at bestemme kemikaliers fysisk-kemiske egenskaber, toksicitet og økotoksicitet med henblik på forordning (EF) nr. 1907/2006.
- (2) Forordning (EF) nr. 440/2008 bør ajourføres, ved at der tilføjes en række nye og ajourførte forsøgsmetoder, som Organisationen for Økonomisk Samarbejde og Udvikling (OECD) har vedtaget for nylig, således at der tages hensyn til den tekniske udvikling, og det sikres, at antallet af dyr, der anvendes til dyreforsøg, begrænses til et minimum i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU ⁽³⁾. De interesserede parter er blevet hørt om dette udkast.
- (3) Tilpasningen til den tekniske udvikling omfatter 20 forsøgsmetoder: en ny metode til bestemmelse af en fysisk-kemisk egenskab, fem nye og en ajourført forsøgsmetode til vurdering af økotoksicitet, to ajourførte forsøgsmetoder til vurdering af skæbne og opførsel i miljøet og fire nye og syv ajourførte forsøgsmetoder til bestemmelse af virkningerne på menneskers sundhed.
- (4) OECD gennemgår regelmæssigt sine retningslinjer for forsøgsvirksomhed (Test Guidelines) med henblik på at identificere dem, der er videnskabeligt forældede. I forbindelse med denne tilpasning til den tekniske udvikling slettes seks forsøgsmetoder, hvor den tilsvarende OECD-testvejledning er blevet ophævet.

⁽¹⁾ EUT L 396 af 30.12.2006, s. 1.

⁽²⁾ Kommissionens forordning (EF) nr. 440/2008 af 30. maj 2008 om fastlæggelse af forsøgsmetoder i henhold til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH) (EUT L 142 af 31.5.2008, s. 1).

⁽³⁾ Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (EUT L 276 af 20.10.2010, s. 33).

- (5) Forordning (EF) nr. 440/2008 bør derfor ændres i overensstemmelse hermed.
- (6) Foranstaltningerne i denne forordning er i overensstemmelse med udtalelse fra det udvalg, der er nedsat ved artikel 133 i forordning (EF) nr. 1907/2006 —

VEDTAGET DENNE FORORDNING:

Artikel 1

Bilaget til forordning (EF) nr. 440/2008 ændres i overensstemmelse med bilaget til denne forordning.

Artikel 2

Denne forordning træder i kraft på tyvendedagen efter offentliggørelsen i *Den Europæiske Unions Tidende*.

Denne forordning er bindende i alle enkeltheder og gælder umiddelbart i hver medlemsstat.

Udfærdiget i Bruxelles, den 14. februar 2017.

På Kommissionens vegne
Jean-Claude JUNCKER
Formand

BILAG

I bilaget til forordning (EF) nr. 440/2008 foretages følgende ændringer:

1) I del A tilføjes følgende kapitel:

»A.25 DISSOCIATIONSKONSTANTER I VAND (TITRERINGSMETODE — SPEKTROFOTOMETRISK METODE — KONDUKTOMETRISK METODE)

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline) 112 (1981).

Forudsætninger

- Passende analysemetode
- Vandopløselighed

Vejledning

- Strukturformel
- Elektrisk ledningsevne for konduktometrisk metode

Generelt om forsøgsmetoden

- Alle forsøgsmetoder kan udføres på rene stoffer eller stoffer af handelskvalitet. De mulige virkninger af urenheder for resultaterne bør tages i betragtning.
- Titreringsmetoden er ikke egnet til tungtopløselige stoffer (jf. Testopløsninger nedenfor).
- Den spektrofotometriske metode gælder kun for stoffer med meget forskellige UV/VIS-absorptionsspektre for dissocierede og uassocierede former. Denne metode kan også være egnet til tungtopløselige stoffer og ikke-syre/base-dissociation, f.eks. kompleksdannelse.
- I tilfælde, hvor Onsager-ligningen holder, kan den konduktometriske metode anvendes, selv ved moderat lave koncentrationer og selv i tilfælde af ikke-syre/base-ligevægt.

Standarddokumenter

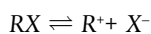
Denne forsøgsmetode er baseret på metoder, der er anført i henvisningerne i afsnittet "Litteratur", og i retningslinjerne af 18. august 1978, Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification EPA.

METODE — INDLEDNING, FORMÅL, ANVENDELSESOMRÅDE, RELEVANS, ANVENDELSE OG AFGRÆNSNING AF TESTEN

Dissociation af et stof i vand har betydning for at kunne vurdere dets indvirkning på miljøet. Det bestemmer stoffets form, som igen bestemmer dets adfærd og transport. Det kan påvirke kemikaliets adsorption på jord og sedimenter og absorption i biologiske celler.

Definitioner og enheder

Dissociation er reversibel opdeling i to eller flere kemiske bestanddele, som kan være ioniske. Processen kendes generelt ved



og koncentrationens ligevægtskonstant for reaktionen er

$$K = \frac{[R^{+}][X^{-}]}{[RX]}$$

F.eks. i det særlige tilfælde, hvor R er hydrogen (stoffet er en syre), er konstanten

$$K_a = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

eller

$$pK_a = pH - \log \frac{[X^-]}{[HX]}$$

Referencestoffer

Følgende referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof skal undersøges. Formålet med dem er primært at sikre, at metoden til enhver tid kan kalibreres og give mulighed for at sammenligne resultaterne med andre anvendte metoder.

	pK_a (1)	Temp. i °C
p-Nitrophenol	7,15	25 (1)
Benzoesyre	4,12	20
p-Chloranilin	3,93	20

(1) Der findes ingen værdi for 20 °C, men det må formodes, at variabiliteten af måleresultaterne er højere end den forventede temperaturafhængighed.

Det ville være nyttigt med et stof med flere pK 'er som anført under Forsøgsmetodens princip nedenfor. Et sådant stof kunne være:

Citronsyre	pK_a (8)	Temp. i °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Forsøgsmetodens princip

Den beskrevne kemiske proces er generelt kun lidt temperaturlafhængig i det miljømæssigt relevante temperaturområde. Bestemmelse af dissociationskonstanten kræver en måling af koncentrationerne af de dissocierede og uassocierede former af det kemiske stof. Ud fra viden om støkiometrien for dissociationsreaktionen, som er angivet under Definitioner og enheder ovenfor, kan den rigtige konstant beregnes. I det tilfælde, der er beskrevet lige netop i denne forsøgsmetode, opfører stoffet sig som en syre eller base, og bestemmelsen foretages nemmest ved at bestemme de relative koncentrationer af de ioniserede og ikke-ioniserede former af stoffet og opløsningens pH-værdi. Forholdet mellem disse betingelser er givet ved ligningen for pK_a i Definitioner og enheder, se ovenfor. Nogle stoffer udviser mere end en dissociationskonstant, og tilsvarende ligninger kan udvikles. Nogle af de heri beskrevne metoder er også velegnede til ikke-syre/base-dissociation.

Kvalitetskriterier

Reproducerbarhed

Dissociationskonstanten bør replikeres (mindst tre bestemmelse) med en nøjagtighed på $\pm 0,1$ logenheder.

BESKRIVELSE AF TESTPROCEDURERNE

Der findes to grundlæggende metoder til bestemmelse af pK_a . Den ene omfatter titrering af en kendt mængde af stoffet med standardsyre eller -base, alt efter hvad der er relevant. Den anden går ud på at finde frem til den relative koncentration af de ioniserede og ikke-ioniserede former og pH-afhængigheden.

Forberedelser

Metoder baseret på disse principper kan klassificeres som titrering, spektrofotometriske og konduktometriske procedurer.

Testopløsninger

Til titreringsmetoden og den konduktometriske metode bør det kemiske stof opløses i destilleret vand. Ved den spektrofotometriske metode og andre metoder anvendes bufferopløsninger. Koncentrationen af teststoffet bør ikke overstige den laveste værdi af 0,01 M eller halvdelen af mætningskoncentrationen, og ved fremstilling af opløsningerne bør der anvendes den reneste tilgængelige form af stoffet. Hvis stoffet kun er svagt opløseligt, kan det opløses i en lille mængde af et opløsningsmiddel, som er blandbart med vand, inden det tilsættes de ovenfor anførte koncentrationer.

Opløsninger bør kontrolleres for emulsioner ved hjælp af en Tyndall-stråle, især hvis der er anvendt et hjælpeopløsningsmiddel til at forbedre opløseligheden. Såfremt der anvendes bufferopløsninger, bør bufferkoncentrationen ikke overstige 0,05 M.

Testbetingelser

Temperatur

Temperaturen bør reguleres til mindst ± 1 °C. Bestemmelsen bør fortrinsvis udføres ved 20 °C.

Hvis der er mistanke om en betydelig temperatúrafhængighed, bør bestemmelsen foretages ved mindst to andre temperaturer. Temperaturintervallerne bør i dette tilfælde være 10 °C og temperaturreguleringen $\pm 0,1$ °C.

Analyser

Metoden vil afhænge af arten af det stof, der testes. Den skal være tilstrækkeligt følsom til, at de forskellige arter for hver koncentration af testopløsningen kan bestemmes.

Testens udførelse

Titreringsmetode

Testopløsningen bestemmes ved titrering med enten standardbase- eller standardsyreopløsningen, idet pH-værdien måles efter hver tilsætning af referenceopløsningen. Der bør foretages mindst 10 tilsætninger inden ækvivalenspunktet. Hvis der opnås ligevægt tilstrækkeligt hurtigt, kan der anvendes et registreringspotentiometer. Til denne metode skal både den samlede mængde af stoffet og dets koncentration kendes nøjagtigt. Der skal tages forholdsregler for at udelukke kuldioxid. Oplysninger om procedure, forholdsregler og beregning findes i standardtest, f.eks. henvisning (1), (2), (3) og (4).

Spektrofotometrisk metode

Bølgelængden er der, hvor de ioniserede og ikke-ioniserede former af stoffet har mærkbart forskellige ekstinktionskoefficienter. UV/VIS-absorptionsspektrummet er fremstillet af opløsninger af konstant koncentration i en pH-tilstand, hvor stoffet er i det væsentlige ioniseret og fuldt ud ioniseret med flere mellemliggende pH-værdier. Dette kan gøres ved enten at tilsætte flere portioner koncentreret syre (base) til en relativt stor mængde opløsning af stoffet i en flerkomponentbuffer, i første omgang ved høj (lav) pH (henvisning 5), eller ved at tilføje lige store mængder af en stamopløsning af stoffet i f.eks. vand, methanol, til konstante mængder af forskellige bufferopløsninger, der dækker det ønskede pH-interval. Ud fra pH- og absorbansværdier på den valgte bølgelængde beregnes et tilstrækkeligt antal værdier for pK_a ved hjælp af data fra mindst fem pH-værdier, når stoffet er mindst 10 % og højst 90 % ioniseret. Yderligere forsøgsoplysninger og beregningsmetode findes i henvisning (1).

Konduktometrisk metode

Ved hjælp af en celle med en lille, kendt cellekonstant måles ledningsevnen for en opløsning af stoffet på ca. 0,1 M i vand til måling af ledningsevne. Ledningsevnen i en række nøjagtige fortyndinger af denne opløsning måles ligeledes. Koncentrationen halveres hver gang, og serien bør som minimum omfatte en størrelsesorden. Den begrænsende ledningsevne ved uendelig fortynding findes ved at gennemføre et lignende forsøg med Na-salt og ekstrapolere. Graden af dissociation kan derefter beregnes ud fra ledningsevnen for hver opløsning ved hjælp af Onsager-ligningen, og dermed kan dissociationskonstanten ved hjælp af Ostwalds fortyndingslov beregnes som $K = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$, hvor C er koncentrationen i mol pr. liter, og α er den dissocierede fraktion. Der skal tages forholdsregler for at udelukke kuldioxid. Yderligere forsøgsoplysninger og beregningsmetode findes i standardtekster og henvisning (1), (6) og (7).

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

Titreringsmetode

pK_a beregnes for 10 målte punkter på titreringskurven. Gennemsnit af og standardafvigelse for sådanne pK_a -værdier beregnes. Der bør indgå et plot af pH-værdien over for mængden af standardbase eller -syre sammen med en tabelpræsentation.

Spektrofotometriske metoder

Absorbans og pH-værdi er opstillet for hvert spektrum. Mindst fem værdier for pK_a beregnes ud fra de mellemliggende spektrale datapunkter, og gennemsnit af og standardafvigelse for resultaterne beregnes også.

Konduktometrisk metode

Den ækvivalente ledningsevne Λ beregnes for hver syrekoncentration og for hver koncentration af en blanding af en ækvivalent af syre plus 0,98 ækvivalent af carbonatfri natriumhydroxid. Der er et overskud af syre for at forhindre overskydende OH^- på grund af hydrolyse. $1/\Lambda$ plottes i forhold til $\sqrt{C}$, og Λ_0 af saltet kan findes ved ekstrapolering til nulkoncentration.

Λ_0 af syren kan beregnes ved at anvende litteraturværdier for H^+ og Na^+ . pK_a kan beregnes ud fra $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_0$ og $K_a = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$ for hver koncentration. Der kan opnås bedre værdier for K_a ved at korrigere for mobilitet og aktivitet. Gennemsnit af og standardafvigelse for pK_a -værdierne bør beregnes.

Testrapport

Alle rådata og beregnede pK_a -værdier bør indgives sammen med beregningsmetoden (helst i tabelformat som foreslået i henvisning 1) ligesom de ovenfor beskrevne statistiske parametre. For titreringsmetoder bør der gives oplysninger om standardisering af referenceopløsninger.

For den spektrofotometriske metode bør alle spektre fremlægges. For den konduktometriske metode bør der gives oplysninger om bestemmelsen af cellekonstant. Der bør gives oplysninger om anvendt teknik, analysemetoder og arten af eventuelle anvendte buffere.

Testtemperaturen eller testtemperaturerne bør rapporteres.

LITTERATUR

- (1) Albert, A. & Sergeant, E.P.: *Ionization Constants of Acids and Bases*, Wiley, Inc., New York, 1962.
- (2) Nelson, N.H. & Faust, S.D.: Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, *Env. Sci. Tech.* 3, II, pp. 1186-1188 (1969).

- (3) ASTM D 1293 — Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.
 - (4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 14th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C., 1976.
 - (5) Clark, J. & Cunliffe, A.E.: Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. *Chem. Ind. (London)* 281, (March 1973).
 - (6) ASTM D 1125 — Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.
 - (7) Standard Method 205 — APHA/AWWA/NPCF (jf. (4) ovenfor).
 - (8) *Handbook of Chemistry and Physics*, 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).«
- 2) Del B, kapitel B.5 affattes således:

»B.5 AKUT ØJENIRRITATION/-ÆTSNING

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline (TG)) 405 (2012). OECD-testvejledningen om test af kemikalier (Test Guidelines for Testing of Chemicals) revideres regelmæssigt for at sikre, at de afspejler den bedste tilgængelige viden. I tidligere revisioner af denne testvejledning er der lagt særlig vægt på de forbedringer, som kan opnås ved at vurdere alle foreliggende oplysninger om testkemikaliet med henblik på at undgå unødvendige forsøg med laboratoriedyr og dermed komme betænkeligheder omkring dyrenes velfærd i møde. I TG 405 (som blev vedtaget i 1981 og ajourført i 1987, 2002 og 2012) indgår en anbefaling om, at man før iværksættelse af den beskrevne in vivo-test for akut øjenirritation/-ætsning bør gennemføre en weight-of-the-evidence-analyse (1) af foreliggende relevante data. Er de foreliggende data utilstrækkelige, anbefales det at udbygge dem ved sekventiel test (2) (3). Den anbefalede teststrategi, som omfatter validerede og anerkendte in vitro-test, er givet som supplement til denne forsøgsmetode. Med henblik på anvendelsen af forordning (EF) nr. 1907/2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH) ⁽¹⁾ omfatter den relevante ECHA-vejledning desuden en integreret teststrategi (21). Dyreforsøg bør kun foretages, hvis det vurderes nødvendigt efter gennemgang af tilgængelige alternative metoder og brug af de metoder, der anses for at være hensigtsmæssige. På tidspunktet for udarbejdelsen af denne ajourførte forsøgsmetode er der tilfælde, hvor det fortsat er nødvendigt eller påkrævet at anvende denne forsøgsmetode i henhold til visse lovrammer.

Den seneste ajourføring fokuserede primært på brug af analgetika og anæstetika uden at påvirke det grundlæggende koncept og strukturen i testvejledningen. ICCVAM ⁽²⁾ og et uafhængigt internationalt peer review-panel evaluerede anvendeligheden af og begrænsningerne for rutinemæssig brug af lokalanæstetika, systemiske analgetika og humane endepunkter ved in vivo-sikkerhedsundersøgelser af øjenirritation (12). Konklusionen på revisionen lød, at man ved at anvende lokalanæstetika og systemiske analgetika kan undgå de fleste eller alle smerter og lidelser uden at påvirke resultatet af testen, og det blev anbefalet, at disse stoffer altid anvendes. Denne forsøgsmetode tager hensyn til denne revision. Lokalanæstetika, systemiske analgetika og humane endepunkter bør anvendes rutinemæssigt ved akut øjenirritation og -ætsning i in vivo-test. Eventuelle undtagelser fra at bruge dem bør begrundes. Med forbedringerne i denne metode vil dyrenes smerter og lidelser i høj grad blive reduceret eller helt undgået i de fleste testsituationer, hvor der fortsat er behov for in vivo-øjen sikkerhedstest.

Afbalanceret forebyggende smertebehandling bør omfatte i) rutinemæssig forbehandling med et lokalt anæstetikum (f.eks. proparacain eller tetracain) og et systemisk analgetikum (f.eks. buprenorphin), ii) rutinemæssig efterbehandling af systemiske analgetika (f.eks. buprenorphin og meloxicam), iii) planlagt observation, overvågning og registrering af dyrene for kliniske tegn på smerte og/eller lidelse og iv) planlagt observation, overvågning og registrering af arten og omfanget af samt udviklingen i alle øjenskader. Yderligere oplysninger kan findes i den ajourførte fremgangsmåde, som er beskrevet i det følgende. Efter indgivelse af testkemikaliet bør der ikke anvendes yderligere lokalanæstetika eller analgetika for at undgå forstyrrelser af forsøget. Analgetika med anti-inflammatorisk aktivitet (f.eks. meloxicam) bør ikke anvendes lokalt, og de systemisk anvendte doser bør ikke forstyrre virkningen på øjet.

Definitioner findes i tillægget til forsøgsmetoden.

⁽¹⁾ Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 af 18. december 2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og ophævelse af Rådets forordning (EØF) nr. 793/93 og Kommissionens forordning (EF) nr. 1488/94 samt Rådets direktiv 76/769/EØF og Kommissionens direktiv 91/155/EØF, 93/67/EØF, 93/105/EF og 2000/21/EF. EUT L 304 af 22.11.2007, s. 1.

⁽²⁾ The US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

Både den videnskabelige kvalitet og dyrenes velfærd fremmes ved, at in vivo-test ikke udføres, før alle relevante data om kemikalietts potentielle øjenætsende eller -irriterende egenskaber er vurderet ved en weight-of-the-evidence-analyse. Sådanne data består af dokumentation fra foreliggende undersøgelser hos mennesker og/eller laboratoriedyr, dokumentation for øjenætsende/-irriterende virkning af et eller flere strukturelt beslægtede stoffer eller af blandinger af sådanne stoffer, data, som viser, at kemikallet er stærkt surt eller basisk (4) (5), og resultater af validerede og anerkendte in vitro- eller ex vivo-test for hudætsning og øjenætsning/-irritation (6) (13) (14) (15) (16) (17). Undersøgelserne kan være blevet foretaget forud for eller som følge af en weight-of-the-evidence-analyse.

For visse kemikalier kan en sådan analyse vise, at der er behov for in vivo-undersøgelser af, om kemikallet eventuelt er øjenætsende/-irriterende. I alle sådanne tilfælde bør der først, inden man overvejer en in vivo-øjentest, helst foretages en undersøgelse af kemikalietts hudætsende virkning i in vitro- og/eller in vivo-test med efterfølgende vurdering i overensstemmelse med den sekventielle teststrategi i forsøgsmetode B.4 (7) eller den integrerede teststrategi i ECHA-vejledningen (21).

Denne forsøgsmetode omfatter en supplerende sekventiel teststrategi, som omfatter validerede in vitro- eller ex vivo-test af øjenætsning/-irritation i forbindelse med REACH, i ECHA-vejledningen (21). Det anbefales, at en sådan teststrategi følges, inden der foretages in vivo-test. For nye kemikalier anbefales en trinvis teststrategi til at indhente videnskabeligt forsvarlige oplysninger om kemikalietts ætsende/irriterende virkning. For eksisterende kemikalier, som ikke er tilstrækkelig undersøgt for hud- og øjenætsning/-irritation, kan strategien anvendes til at supplere de mangelfulde data. Anvendes en anden teststrategi eller -metode, eller beslutter man sig for ikke at følge den trinvis teststrategi, bør dette begrundes.

IN VIVO-TESTENS PRINCIP

Efter forbehandling med et systemisk analgetikum og induktion af et passende lokal anæstetikum, påføres det kemikalie, der skal testes, i en enkelt dosis til forsøgsdyrets ene øje; det ubehandlede øje tjener som kontrol. Graden af øjenirritation/-ætsning vurderes ved tildeling af scoreværdier til læsionerne af conjunctiva, cornea og iris med bestemte intervaller. Andre virkninger på øjet og systemiske negative virkninger beskrives ligeledes, således at man har en fuldstændig bedømmelse af virkningerne. Undersøgelsen bør strække sig over tilstrækkelig lang tid til, at virkningernes reversibilitet eller irreversibilitet kan vurderes.

Dyr, der på noget tidspunkt under testen viser tegn på stærk lidelse og/eller smerte eller læsioner, som svarer til de humane endepunkter, som er beskrevet i denne forsøgsmetode (jf. punkt 26), bør aflives humanitært, og kemikallet bør vurderes tilsvarende. Kriterierne for at træffe beslutningen om human aflivning af døende og stærkt lidende dyr kan findes i en OECD-vejledning (8).

FORBEREDELSE TIL IN VIVO-TESTEN

Valg af art

Det foretrukne forsøgsdyr er albinokaninen, og der anvendes raske unge kønsmodne dyr. Anvendes andre arter, bør der fremlægges begrundelse herfor.

Forberedelse af dyr

På hvert af de foreløbigt udvalgte dyr bør begge øjne undersøges, højst 24 timer før testen begynder. Dyr, som udviser øjenirritation eller øjendefekter, eller som i forvejen har beskadiget cornea, bør ikke anvendes.

Miljø og fodringsbetingelser

Dyrene bør holdes i hvert sit bur. Temperaturen i forsøgslokalet bør være 20 °C ($\pm$ 3 °C) for kaniner. Den relative luftfugtighed bør være mindst 30 % og helst ikke over 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen bør være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke. Alt for høj lysintensitet bør undgås. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder og fri adgang til drikkevand.

TESTPROCEDURE

Brug af lokalanæstetika og systemiske analgetika

Det anbefales at følge nedenstående procedurer for at undgå eller minimere smerte og lidelse under testproceduren for øjensikkerhed. Alternative fremgangsmåder, som har vist sig at give lige så god eller bedre undgåelse eller lindring af smerte eller lidelse, kan anvendes.

- 60 minutter før det kemiske stof påføres, indgives buprenorphin 0,01 mg/kg ved subkutan injektion for at opnå et terapeutisk niveau af systemiske analgetika. Buprenorphin og andre lignende opioide analgetika, der indgives systemisk, er ikke kendt for eller ventes ikke at ændre øjets respons (12).
- Fem minutter før det kemiske stof tilsættes, tilføres en eller to dråber af et lokalt anæstetikum til øjnene (f.eks. 0,5 % proparacainhydrochlorid eller 0,5 % tetracainhydrochlorid) i hvert øje. For at undgå mulige forstyrrelser i forbindelse med undersøgelsen anbefales det at anvende et lokalt anæstetikum, der ikke indeholder konserveringsmidler. Det øje på hvert dyr, der ikke behandles med testkemikaliet, men som behandles med lokalanæstetika, tjener som kontrol. Hvis testkemikaliet forventes at fremkalde betydelig smerte og lidelse, bør det normalt ikke testes in vivo. I tilfælde af tvivl, eller når test er nødvendigt, bør man være opmærksom på yderligere applikationer af lokalanæstetikum med 5-minutters intervaller, før det kemiske stof påføres. Brugerne bør være opmærksomme på, at flere applikationer af lokalanæstetika potentielt kan forårsage en mindre stigning i styrken af og/eller den tid, der kræves, før kemisk inducerede læsioner forsvinder.
- Otte timer efter det kemiske stof er påført, indgives buprenorphin 0,01 mg/kg ved subkutan injektion og meloxicam 0,5 mg/kg ved subkutan injektion for at sikre et fortsat terapeutisk niveau af systemiske analgetika. Selv om der ikke findes data, som tyder på, at meloxicam har anti-inflammatoriske virkninger i øjet, når det indgives ved subkutan injektion en gang dagligt, bør meloxicam ikke indgives før mindst otte timer efter, at det kemiske stof er påført, for at undgå forstyrrelser i undersøgelsen (12).
- Otte timer efter behandlingen med det kemiske stof bør der indgives buprenorphin 0,01 mg/kg ved subkutan injektion hver 12. time, sammen med meloxicam 0,5 mg/kg ved subkutan injektion hver 24. time, indtil øjenlæsionerne svinder, og der ikke længere er kliniske tegn på smerte og lidelse. Der findes analgetikumpræparater med langsom frigivelse, som kan overvejes for at reducere hyppigheden af analgetikumdosering.
- "Redningsanalgetika" bør gives, umiddelbart efter det kemiske stof er påført, hvis forebyggende analgetika og lokalanæstetika er utilstrækkelige. Hvis et dyr viser tegn på smerte og lidelse i løbet af undersøgelsen, gives straks en "redningsdosis" buprenorphin 0,03 mg/kg ved subkutan injektion, som gentages så ofte som hver 8. time, hvis det er nødvendigt, i stedet for 0,01 mg/kg ved subkutan injektion hver 12. time. Sammen med denne "redningsdosis" buprenorphin indgives meloxicam 0,5 mg/kg ved subkutan injektion hver 24. time, men først mindst 8 timer efter det kemiske stof er påført.

Applikation af testkemikaliet

Testkemikaliet bør anbringes i conjunctivalsækken af det ene øje på hvert dyr, idet det nederste øjenlåg forsigtigt trækkes lidt ud fra øjeæblet. Derefter holdes øjenlågene sammen i ca. et sekund for at forhindre, at noget af materialet løber ud. Det ubehandlede øje fungerer som kontrol.

Skylning

I mindst 24 timer efter instillation af testkemikaliet bør der ikke foretages skylning af forsøgsdyrenes øjne, bortset fra faststof (jf. punkt 18) eller i tilfælde af øjeblikkeligt indsættende ætsende eller irriterende virkning. Efter 24 timer kan øjet skylles, hvis det anses for hensigtsmæssigt.

Anvendelse af en satellitgruppe af dyr til undersøgelse af virkningen af skylningen kan ikke anbefales, medmindre det er videnskabeligt begrundet. Er en satellitgruppe nødvendig, bør den bestå af to kaniner. Skylningsomstændighederne bør nøje dokumenteres, således skylningstidspunkt, skyllevæskens sammensætning og temperatur samt skylningens varighed, anvendt væskevolumen og -hastighed.

Dosisniveau**1) Undersøgelse af væsker**

Ved undersøgelse af væsker anvendes 0,1 ml. Der bør ikke anvendes pumpespray til direkte instillation af kemikaliet i øjet. I stedet bør væsken sprøjtes ud af sprayflasken og opsamles i et kar, før der instilleres 0,1 ml i øjet.

2) Undersøgelse af faste stoffer

Ved undersøgelse af faste stoffer, pastaer og fintfordelte faste kemikalier bør der anvendes et volumen på 0,1 ml eller en vægtmængde på højst 100 mg. Testkemikaliet bør rives til finkornet støv. Partiklernes volumen bør måles efter let sammenpresning, f.eks. frembragt ved små slag på målekarret. Er det faste testkemikalie ikke forsvundet fra dyrets øje ad naturlig vej på det første observationstidspunkt en time efter behandlingen, kan øjet skylles med saltvand eller destilleret vand.

3) Undersøgelse af aerosoler

Det anbefales, at alle pumpesprayprodukter og aerosoler opsamles før instillation i øjet. Den eneste undtagelse er kemikalier, som er under tryk i aerosolbeholdere og derfor ikke kan opsamles på grund af fordampning. I sådanne tilfælde bør øjet holdes åbent, og testkemikaliet indgives i øjet med et enkelt pust på ca. et sekund fra en afstand af 10 cm direkte foran øjet. Afstanden kan variere, afhængigt af trykket i aerosolbeholderen og dens indhold. Der bør drages omsorg for at undgå skade på øjet som følge af trykket i spraydåsen. I visse tilfælde kan der være brug for at vurdere potentialet for "mekanisk" skade på øjet forårsaget af forstøvningens styrke.

Den afgivne dosis fra aerosolbeholderen kan vurderes ved at simulere prøven på følgende måde: Kemikaliet sprøjtes på vejepapir gennem en åbning på størrelse med et kaninøje placeret umiddelbart foran papiret. Papirets vægtforøgelse anvendes som omtrentligt mål for den mængde, der tilføres øjet ved forstøvning. For flygtige kemikalier kan dosis vurderes ved vejning af den modtagende beholder før og efter udtagning af testkemikaliet.

Indledende test (in vivo-test af øjenirritation/-ætsning i et dyr)

Det anbefales stærkt, at in vivo-testen indledningsvist kun udføres i et dyr (se Supplement til denne forsøgsmetode: Sekventiel teststrategi for øjenirritation og ætsning). Observationerne bør give mulighed for at bestemme styrke og reversibilitet, inden der foretages en verifikationstest på et andet dyr.

Viser denne test, at kemikaliet virker ætsende eller stærkt irriterende på øjet ved brug af den beskrevne fremgangsmåde, bør der ikke udføres yderligere test for øjenirritation.

Verifikationstest (in vivo-øjenirritationstest i yderligere dyr)

Har den indledende test ikke vist ætsende eller stærkt irriterende virkning, bør den irriterende eller negative respons verificeres i indtil to yderligere dyr. Observeres der i den indledende test en stærkt irriterende virkning, anbefales det at udføre dette sekventielt i et dyr ad gangen frem for at eksponere yderligere to dyr samtidig. Udviser det andet dyr ætsning eller stærk irritation, standses testen. Hvis resultaterne fra det andet dyr er tilstrækkelige til, at der kan bestemmes en fareklassificering, bør der ikke udføres yderligere forsøg.

Observationsperiode

Observationsperioden bør være tilstrækkelig lang til, at de observerede virkningers omfang og reversibilitet kan vurderes fuldt ud. Testen bør imidlertid afsluttes, når som helst dyrene viser tegn på stærk smerte eller lidelser (8). For at bestemme reversibiliteten af virkningerne bør dyrene sædvanligvis observeres indtil 21 dage efter indgivelse af testkemikaliet. Observeres reversibilitet inden 21 dage, bør testen afsluttes på dette tidspunkt.

Kliniske observationer og klassificering af øjenrespons

Øjnene bør vurderes grundigt med henblik på tilstedeværelse eller fravær af øjnlæsioner, en time efter det kemiske stof er påført, efterfulgt af mindst en daglig evaluering. Dyrene bør evalueres flere gange dagligt i de første tre dage for at sikre, at beslutninger om at afslutte testen træffes i tide. Forsøgsdyrene bør under hele undersøgelsen vurderes regelmæssigt for kliniske tegn på smerte og/eller lidelse (f.eks. tager poterne op til øjet eller gnider i øjet, overdreven blinken, overdreven tåredannelse) (9) (10) (11) mindst to gange dagligt med mindst seks timer mellem observationerne eller om nødvendigt oftere. Dette er nødvendigt for at i) foretage en tilstrækkelig vurdering af, om dyrene viser tegn på smerte og lidelse, for at kunne træffe informerede beslutninger om behovet for at øge doseringen af analgetika og ii) vurdere, om dyrene viser tegn på etablerede humane endepunkter for at træffe informerede beslutninger om, hvorvidt det er hensigtsmæssigt at aflive dyrene humant, og sikre, at sådanne beslutninger træffes i tide. Fluoresceinfarvning bør anvendes rutinemæssigt, og der bør, hvor det findes hensigtsmæssigt (f.eks. til vurdering af skadens dybde ved ulceration af cornea), anvendes en spaltelampe som hjælp til at finde og måle skaden på øjet og vurdere, om de etablerede endepunktkriterier for human aflivning er opfyldt. Der kan indsamles digitale billeder af observerede læsioner til reference og som permanent registrering af omfanget af øjenskaden. Dyrene bør ikke forblive længere i forsøget, end indtil dette har givet definitive oplysninger. Dyr, som viser tegn på stærk lidelse og/eller smerte, bør omgående aflives humant, og testkemikaliets vurderes tilsvarende.

Når følgende øjnlæsioner optræder efter instillation af testkemikaliets, bør dyret aflives humant (se tabel 1 for at få en beskrivelse af læsionsgrader): perforation af cornea eller nævneværdig ulceration af cornea, herunder staphylo; blod i forreste øjenkammer; uklarhed af cornea af grad 4; manglende respons på lys (irisrespons grad 2), persisterende i 72 timer; ulceration af conjunctivalimhinden; nekrose af conjunctivae eller blinkhinde; rynker i cornea. Begrundelsen herfor er, at sådanne læsioner sædvanligvis er irreversible. Endvidere anbefales det, at følgende øjnlæsioner anvendes som humane endepunkter for at afslutte undersøgelser inden udløbet af den planlagte observationsperiode på 21 dage. Disse læsioner anses for at være tegn på svært irriterende eller ætsende skader og skader, som ikke forventes at reversere fuldt ud ved udgangen af den 21 dage lange observationsperiode: alvorlig dybde af skaden (f.eks. ulceration af cornea, der strækker sig ud over de overfladiske lag af stroma), limbusdestruktion > 50 % (påvist ved afblegning af conjunctivalvæv) og alvorlig øjeninfektion (purulent sekretion). En kombination af: vascularisation af overfladen af cornea (dvs. pannus); område med fluoresceinfarvning, der ikke mindskes over tid baseret på en daglig vurdering; og/eller manglende re-epithelialisering, fem dage efter testkemikaliets er påført, kan også betragtes som et potentielt nyttigt kriterium, der påvirker den kliniske beslutning om at afslutte undersøgelsen tidligt. Hver for sig er disse resultater imidlertid ikke tilstrækkelige til at afslutte undersøgelsen tidligt. Når der er identificeret en alvorlig øjenskade, bør en tilstedeværende eller kvalificeret laboratoriedyr læge eller personale, som er uddannet til at identificere kliniske læsioner, konsulteres med henblik på en klinisk undersøgelse for at fastslå, om kombinationen af disse virkninger giver grund til at afslutte undersøgelsen tidligt. Graden af øjenrespons (conjunctivae, cornea og iris) bør indhentes og registreres 1, 24, 48 og 72 timer efter påføring af testkemikaliets (tabel 1). For dyr, som ikke udvikler øjnlæsioner, kan forsøget tidligst afsluttes tre dage efter instillation. Dyr med øjnlæsioner, der ikke er alvorlige, bør observeres, indtil læsionerne forsvinder, eller i 21 dage, på hvilket tidspunkt testen afsluttes. Observationerne bør foretages og registreres efter mindst 1 time, 24 timer, 48 timer, 72 timer, 7 dage, 14 dage og 21 dage med henblik på at fastslå status for læsioner og deres reversibilitet eller irreversibilitet. Der bør foretages hyppigere observationer, hvis det er nødvendigt for at afgøre, hvorvidt forsøgsdyret bør aflives af humane grunde eller fjernes fra testen på grund af negative resultater.

Graden af øjnlæsioner (tabel 1) bør registreres ved hver undersøgelse. Alle andre læsioner i øjet (f.eks. pannus, farvning, ændringer i det forreste øjenkammer) og systemiske negative virkninger bør ligeledes rapporteres.

Undersøgelse af respons kan lettes ved brug af lup-briller, håndspaltelampe, binokulært mikroskop eller andre hensigtsmæssige hjælpemidler. Efter registrering af observationerne i 24 timer kan øjnene undersøges yderligere med fluorescein.

Klassificeringen af øjenrespons er nødvendigvis subjektiv. For at give en mere ensartet klassificering af øjenrespons og for at bistå prøvningslaboratorierne og dem, som foretager og fortolker observationerne, skal observationerne foretages af personer, som er tilstrækkeligt fortrolige med det anvendte score-system. Klassificeringen af øjenrespons foretages blindt.

DATA OG RAPPORTERING

Vurdering af resultater

Scoreværdierne for øjenirritation bør vurderes i tilknytning til læsionernes art, sværhedsgrad og reversibilitet eller manglende reversibilitet. De enkelte scoreværdier repræsenterer ikke en absolut standard for et kemikalies irritationsfremkaldende egenskaber, da andre virkninger af testkemikaliets ligeledes vurderes. I stedet bør de enkelte scoreværdier betragtes som vejledende værdier, som kun er meningsfulde, når de støttes af en fuldstændig beskrivelse og evaluering af alle observationer.

Testrapport

Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Begrundelsen for in vivo-test: weight-of-the-evidence-analyse af allerede foreliggende testdata, herunder resultater af den sekventielle teststrategi:

- beskrivelse af relevante oplysninger fra foreliggende tidligere forsøg
- oplysninger afledt af de enkelte trin i teststrategien
- beskrivelse af udførte in vitro-test med detaljeret beskrivelse af de anvendte metoder og resultater opnået med test-/referencekemikalier
- beskrivelse af den udførte in vivo-test af hudirritation/-ætsning med angivelse af opnåede resultater
- weight-of-the-evidence-analyse med henblik på udførelse af in vivo-test.

Testkemikalie:

- identifikationsdata (f.eks. kemisk betegnelse og eventuelt CAS-nummer, renhed, kendte urenheder, kilde, batchnummer)
- fysisk tilstand og fysisk-kemiske egenskaber (f.eks. pH, flygtighed, opløselighed, stabilitet, reaktion med vand)
- for blandinger bør bestanddelene identificeres, herunder stoffernes identifikationsdata (f.eks. kemisk betegnelse og eventuelt CAS-nummer) og deres koncentrationer
- anvendt dosis.

Bærestof:

- identifikation, koncentration (i givet fald), anvendt volumen
- begrundelse for valg af bærestof.

Forsøgsdyr:

- anvendt art/stamme, begrundelse for anvendelse af andre dyr end albinokaniner
- hvert dyrs alder ved testens begyndelse
- antal dyr af hvert køn i testgruppe og kontrolgruppe (hvis nødvendigt)
- de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse og slutning
- oprindelse, miljøbetingelser, kost osv.

Anæstetika og analgetika:

- doser og tidspunkter, hvor lokalanæstetika og systemiske analgetika blev indgivet
- hvis et lokalanæstetikum benyttes, identifikation, renhed, art og potentiel interaktion med testkemikaliets.

Resultater:

- beskrivelse af den anvendte metode til fastlæggelse af irritationsscore på hvert observationstidspunkt (f.eks. håndspaltelampe, binokulært mikroskop, fluorescein)
- angivelse i tabelform af irritations-/ætsningsresponsdata for hvert dyr på hvert observationstidspunkt, indtil dyret tages ud af testen
- forklarende beskrivelse af graden og arten af den observerede irritation eller ætsning
- beskrivelse af alle andre observerede læsioner i øjet (f.eks. karindvækst, pannusdannelse, adhæsion, farvning)
- beskrivelse af ikke-okulære lokale og systemiske negative virkninger, registrering af kliniske tegn på smerte og lidelse, digitale fotografier og eventuelle histopatologiske fund.

*Diskussion af resultater***Fortolkning af resultaterne**

Resultaterne af øjenirritationsundersøgelser i laboratoriedyr kan kun i begrænset omfang overføres til mennesker. I mange tilfælde er albinokaniner mere følsomme end mennesker for øjenirriterende eller -ætsende stoffer.

Fortolkning af data bør ske med forbehold, så man undgår at medtage irritation forårsaget af sekundær infektion.

LITTERATUR

- (1) Barratt, M.D., *et al.* (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard, ECVAM Workshop Report 8, ATLA 23, 410-429.
- (2) de Silva, O., *et al.* (1997), Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies, Food Chem. Toxicol 35, 159-164.
- (3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999), A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177.
- (4) Young, J.R., *et al.* (1988), Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals, Toxicol. In Vitro, 2, 19-26.
- (5) Neun, D.J. (1993), Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH, J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227-231.
- (6) Fentem, J.H., *et al.* (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, pp. 483-524.
- (7) Kapitel B.4 i dette bilag, Akut hudirritation/-ætsning.
- (8) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. (<http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).
- (9) Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. (1985), Animal pain: evaluation and control, Lab Animal, May/June, 20-36.
- (10) National Research Council (NRC) (2008), Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.
- (11) National Research Council (NRC) (2009), Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

- (12) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing, NIH Publication No. 10-7514, Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences.

<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest-TMER.htm>

- (13) Kapitel B.40 i dette bilag, *In vitro*-hudætsning: måling af transkutan elektrisk modstand (TER).
- (14) Kapitel B.40.A i dette bilag, *In vitro*-hudætsning: test med human hudmodel.
- (15) OECD (2006), Test No. 435: *In vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.
- (16) Kapitel B.47 i dette bilag, *Forsøgsmetode til påvisning af oksecornea-uklarhed og -permeabilitet (BCOP-forsøgsmetoden) til identifikation af i) kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade, og ii) kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade.*
- (17) Kapitel B.48 i dette bilag, *Isoleret kyllingeøje-forsøgsmetoden (ICE-forsøgsmetoden) til identifikation af i) kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade, og ii) kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade.*
- (18) U.S. EPA (2003), Label Review Manual: 3rd Edition, EPA737-B-96-001, Washington, DC: U.S., Environmental Protection Agency.
- (19) UN (2011), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications.
- (20) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006. EUT L353, 1-1355.
- (21) ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7a: Endpoint specific guidance.

http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

Tabel 1

Klassificering af øjenskader

Cornea	Grad
Uklarhed: graden af uklarhed bør aflæses i det tætteste område (*)	
Ingen ulceration eller uklarhed	0
Spredte eller diffuse uklare områder (ikke bestående i en let mattering af den normale glans); detaljer i iris klart synlige	1
Let skelneligt halvgennemsgigt område; detaljer i iris let slørede	2
Område med perlemorsglans; ingen detaljer i iris synlige; pupilstørrelse kan knapt skelnes	3

Cornea	Grad
Uklar cornea; iris ikke skelnelig gennem uklarheden	4
Maksimum: 4	
Iris	
Normal	0
Markant fordybede rugae, kongestion, hævelse, moderat hyperæmi omkring cornea; eller injektion; iris reagerer på lys (træg lysrespons anses for en virkning)	1
Blødning, massiv ødelæggelse eller ingen reaktion på lys	2
Maksimum: 2	
Conjunctivae	
Rødme (af conjunctiva palpebrae og conjunctiva bulbi; bortset fra cornea og iris)	
Normal	0
Nogle blodkar hyperæmiske (injektion)	1
Diffus, blodrød farve; de enkelte kar ikke let skelnelige	2
Diffus oksekødsfarvet	3
Maksimum: 3	
Chemosis	
Hævelse (omkring øjenlåg og/eller blinkhinder)	
Normal	0
Nogen unormal hævelse	1
Tydelig hævelse med delvis udkrængning af øjenlåg	2
Hævelse med øjenlåg omtrent halvt lukket	3
Hævelse med øjenlåg mere end halvt lukket	4
Maksimum: 4	
(*) Området med cornea-uklarhed bør angives.	

Tillæg

DEFINITIONER

Syre/base-reserve: For sure præparater, mængden (g) af natriumhydroxid/100 g præparat, der kræves for at frembringe en bestemt pH-værdi. For basiske præparater, mængden (g) af natriumhydroxid svarende til g svovlsyre/100 g præparat, der kræves for at frembringe en bestemt pH-værdi (Young *et al.* 1988).

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

Ikke-irriterende stoffer: Stoffer, der ikke er klassificeret som øjenirriterende stoffer i EPA-kategori I, II eller III eller GHS-kategori 1, 2, 2A eller 2B eller EU-kategori 1 eller 2 (17) (18) (19).

Øjenætsende stof: a) Et kemikalie, der forårsager irreversibel vævsbeskadigelse i øjet, b) kemikalier, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i GHS-kategori 1, EPA-kategori I eller EU-kategori 1 (17) (18) (19).

Øjenirriterende stof: a) et kemikalie, der forårsager en reversibel ændring i øjet, b) kemikalier, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i EPA-kategori II eller III, eller øjenirriterende stoffer i GHS-kategori 2, 2A eller 2B eller EU-kategori 2 (17) (18) (19).

Stærkt øjenirriterende stof: a) et kemikalie, som forårsager vævsbeskadigelse i øjet, som ikke er forsvundet inden for 21 dage efter påføring, eller som forårsager alvorlig fysisk synsnedsættelse, b) kemikalier, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i GHS-kategori 1 eller EPA-kategori I eller EU-kategori 1 (17) (18) (19).

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

Trinvis strategi: Ved anvendelse af den trinvis teststrategi gennemgås alle eksisterende oplysninger om et testkemikalie i en bestemt rækkefølge ved anvendelse af en weight-of-the-evidence-proces på hvert trin for at fastslå, om der foreligger tilstrækkelige oplysninger til at træffe en fareklassificeringsafgørelse, inden der fortsættes til næste trin. Hvis et testkemikalies irritationspotentiale kan underbygges baseret på eksisterende oplysninger, er der ikke behov for at foretage yderligere test. Hvis et testkemikalies irritationspotentiale ikke kan underbygges baseret på eksisterende oplysninger, foretages en trindelt sekventiel dyreforsøgsprocedure, indtil der kan foretages en utvetydig klassificering.

Weight-of-the-evidence (proces): Styrker og svagheder ved indsamling af oplysninger anvendes som grundlag for en konklusion, der muligvis ikke kan ses ud fra de individuelle data.

SUPPLEMENT TIL FORSØGSMETODE B.5 ⁽¹⁾**SEKVENTIEL TESTSTRATEGI FOR ØJENIRRITATION OG -ÆTSNING****Generelle betragtninger**

Såvel hensynet til den videnskabelige kvalitet som til dyrenes velfærd taler for at undgå unødvendig brug af dyr og at minimere alle test, som kan forventes at fremkalde svære responser i dyr. Alle oplysninger om et kemikalies potentielle øjenætsende og -irriterende egenskaber bør vurderes, før in vivo-test overvejes. Der foreligger muligvis allerede tilstrækkelige vidnesbyrd til, at testkemikaliet har potentiale for ætsning eller irritation af øjnene kan klassificeres, uden at der er behov for laboratorieforsøg udført med dyr. Ved hjælp af weight-of-the-evidence-analyse og en sekventiel teststrategi kan behovet for in vivo-test således nedsættes til et minimum, navnlig når kemikaliet forventes at fremkalde svære responser.

Det anbefales, at de foreliggende oplysninger om kemikaliers øjenirriterende og -ætsende egenskaber vurderes ved weight-of-the-evidence-analyse for at afgøre, om der ud over in vivo-øjensundersøgelser bør udføres supplerende undersøgelser til nærmere karakterisering af et sådant potentiale. Når yderligere undersøgelser er nødvendige, anbefales det at benytte den sekventielle teststrategi til fastlæggelse af de relevante forsøgsdata. For ikke tidligere testede stoffer bør den sekventielle teststrategi anvendes til at fastlægge det sæt data, som er nødvendigt til vurdering af stoffets potentiale for øjenirritation/-ætsning. Den i dette bilag beskrevne indledende teststrategi er udviklet på en OECD-workshop (1). Den er senere blevet bekræftet og udvidet i form af Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, som vedtoges på det 28. fælles møde mellem OECD's kemikalieudvalg og arbejdsgruppe vedrørende kemikalier i november 1998 (2), og blev ajourført af en OECD-ekspertgruppe i 2011.

Skønt denne teststrategi ikke indgår som en del af forsøgsmetode B.5, er det den anbefalede strategi til bestemmelse af øjenirritation/-ætsning. Strategien repræsenterer både bedste praksis og en etisk standard for in vivo-test af øjenirritation/-ætsning. Forsøgsmetoden giver vejledning i udførelse af in vivo-test og sammenfatter de faktorer, som man bør tage i betragtning, før en sådant test overvejes. Strategien tilvejebringer en weight-of-the-evidence-metode til evaluering af foreliggende oplysninger om testkemikaliet øjenirriterende/-ætsende egenskaber og en trinvis fremgangsmåde til at generere relevante data om kemikalier, hvor der er behov for yderligere undersøgelse, eller som ikke er blevet undersøgt. Strategien indebærer, at der først udføres validerede og anerkendte in vivo- eller ex vivo-test, og derefter forsøgsmetode B.4, alt efter omstændighederne (3) (4).

Beskrivelse af den trinvis teststrategi

Før man iværksætter test som led i den sekventielle teststrategi (vist i figuren), bør alle foreliggende oplysninger vurderes for at afgøre nødvendigheden af in vivo-øjentest. Skønt vurdering af enkeltparametre (f.eks. ekstremt pH) i sig selv kan tænkes at give væsentlige oplysninger, bør alle de foreliggende oplysninger betragtes under ét. Som grundlag for en afgørelse baseret på weight-of-the-evidence bør alle relevante oplysninger om virkningerne af det pågældende kemikalie og dets strukturelle analoge stoffer evalueres, og en begrundelse for afgørelsen bør fremlægges. Primært bør foreliggende oplysninger om kemikaliet virkning på dyr og mennesker tillægges vægt, efterfulgt af resultaterne af in vivo- eller ex vivo-test. Når det på nogen måde er muligt, bør in vivo-undersøgelser af ætsende kemikalier undgås. I teststrategien bør følgende faktorer tages i betragtning:

Vurdering af foreliggende data fra mennesker og/eller dyr og/eller in vitro-data fra validerede og internationalt anerkendte metoder (trin 1).

⁽¹⁾ Yderligere oplysninger om anvendelse af en integreret teststrategi for øjenirritation i henhold til REACH findes i ECHA's vejledning om informationskrav og kemikaliesikkerhedsvurdering (Guidance on information requirements and chemical safety assessment), kapitel R.7a: Specifik vejledning i endepunkter http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

Foreliggende data fra mennesker, f.eks. kliniske undersøgelser eller arbejdsmiljøundersøgelser, case-undersøgelser og/eller data fra dyreforsøg fra f.eks. øjenstudier og/eller in vitro-data fra validerede og internationalt anerkendte metoder for øjenirritation/-ætsning bør primært tages i betragtning, da de giver oplysninger, som direkte vedrører virkninger på øjnene. Derefter bør foreliggende data fra undersøgelser af hudætsning/-irritation hos mennesker og/eller i dyr og/eller in vitro-undersøgelser fra validerede og internationalt anerkendte metoder for hudætsning vurderes. Kemikalier med kendt ætsende eller svært irriterende virkning på øjet bør ikke instilleres i øjnene på dyr, hvilket ligeledes gælder kemikalier, som virker ætsende eller svært irriterende på huden, da disse også må anses for at virke ætsende og/eller irriterende på øjnene. Kemikalier, for hvilke der foreligger tilstrækkelig dokumentation for manglende ætsende og irriterende virkning fra tidligere øjenstudier, bør heller ikke testes i in vivo-øjenstudier.

Analyse af struktur/aktivitetrelationer (trin 2).

Resultater fra eventuelle undersøgelser af strukturelt beslægtede kemikalier bør tages i betragtning. Når der for strukturelt beslægtede stoffer eller blandinger af sådanne stoffer foreligger tilstrækkelige data fra mennesker og/eller dyr til at bestemme deres øjenætsende/-irriterende potentiale, kan testkemikaliets antages at ville frembringe samme respons. I sådanne tilfælde behøver testkemikaliets ikke nødvendigvis testes. Negative data fra undersøgelser af strukturelt beslægtede stoffer eller blandinger af sådanne stoffer udgør ikke tilstrækkeligt bevis for fravær af ætsende eller irriterende egenskaber af et kemikalie i den sekventielle teststrategi. Potentialet for ætsende og irriterende virkning på både hud og øjne bør fastlægges ved validerede og anerkendte metoder til analyse af struktur/aktivitetrelationer.

Fysisk-kemiske egenskaber og kemisk reaktivitet (trin 3).

Kemikalier, som udviser en ekstrem pH-værdi som $\leq 2,0$ eller $\geq 11,5$, kan have stærke lokale virkninger. Hvis en ekstrem pH-værdi er grundlaget for at udpege et kemikalie som ætsende eller irriterende for øjnene, kan også dets syre/basereserve (eller bufferkapacitet) tages i betragtning (5) (6) (7). Tyder kemikaliet bufferkapacitet på, at det muligvis ikke virker ætsende på øjnene (dvs. kemikalier med ekstrem pH-værdi og lav syre/basereserve), bør dette bekræftes ved yderligere test, fortrinsvis med brug af en valideret og anerkendt in vitro- eller ex vivo-test (jf. punkt 10).

Hensyntagen til andre foreliggende oplysninger (trin 4).

Alle foreliggende oplysninger om systemisk toksicitet ved påføring på huden vurderes på dette trin. Testkemikaliet akutte toksicitet ved optagelse gennem huden bør ligeledes tages i betragtning. Er testkemikaliets påviseligt meget toksisk ved optagelse gennem huden, behøver det ikke nødvendigvis testes i øjnene. Skønt der ikke nødvendigvis er sammenhæng mellem akut toksicitet ved optagelse gennem huden og øjenirritation/ætsning, kan man gå ud fra, at når et agens er meget toksisk ved optagelse gennem huden, vil det ligeledes vise sig meget toksisk ved instillation i øjet. Sådanne oplysninger kan ligeledes tages i betragtning mellem trin 2 og 3.

Vurdering af kemikaliet hudætsende egenskaber, hvis dette også er et lovkrav (trin 5).

Kemikaliet hudætsende og svært irriterende egenskaber bør først vurderes i overensstemmelse med forsøgsmetode B.4 (4) og det ledsagende bilag (8), herunder anvendelse af validerede og internationalt anerkendte in vitro-forsøgsmetoder vedrørende hudætsning (9) (10) (11). Hvis kemikaliets har vist sig at forårsage ætsning eller svær hudirritation, kan det også anses for at være ætsende eller svært irriterende for øjnene. Yderligere test er således ikke påkrævet. Er kemikaliets ikke ætsende eller stærkt hudirriterende, bør der udføres en in vivo- eller ex vivo-øjentest.

Resultater af in vitro- eller ex vivo-test (trin 6).

Kemikalier, som har udvist ætsende eller stærkt irriterende egenskaber i en in vitro- eller ex vivo-test (12) (13), som er valideret og internationalt anerkendt specielt til vurdering af øjenætsende/-irriterende virkninger, behøver ikke testes i dyreforsøg. Sådanne kemikalier må antages at ville frembringe tilsvarende svære virkninger in vivo. Foreligger der ikke validerede og anerkendte in vitro- og/eller ex vivo-test, springes trin 6 over, og der fortsættes direkte med trin 7.

In vivo-test i kaniner (trin 7 og 8).

In vivo-øjentest bør begynde med en indledende test i et dyr. Viser kemikaliet sig i denne test ætsende eller stærkt irriterende på øjet, bør yderligere test ikke udføres. Viser testen ingen ætsende eller ingen stærkt irriterende virkninger, udføres en verifikationstest i yderligere to dyr. Afhængigt af resultatet af verifikationstesten kan der være behov for yderligere test. [Se forsøgsmetode B.5]

EN STRATEGI FOR TEST OG VURDERING AF ØJENIRRITATION/-ÆTSNING

	Aktivitet	Resultat	Konklusion
1	Foreliggende data fra mennesker og/eller dyr og/eller in vitro-data fra validerede og internationalt anerkendte metoder, der viser virkninger på øjnene. Foreliggende data fra mennesker og/eller dyr og/eller in vitro-data fra validerede og internationalt anerkendte metoder, der viser ætsende virkninger på huden. Foreliggende data fra mennesker og/eller dyr og/eller in vitro-data fra validerede og internationalt anerkendte metoder, der viser stærkt irriterende virkninger på huden.	Svær øjenskade Øjenirriterende Virker ikke ætsende/irriterende på øjnene Hudætsende Svært hudætsende	Apikalt endepunkt: bør anses for at virke ætsende på øjnene. Ingen test nødvendig. Apikalt endepunkt: bør anses for at virke irriterende på øjnene. Ingen test nødvendig. Apikalt endepunkt: anses for ikke at virke ætsende eller irriterende på øjnene. Ingen test nødvendig. Bør anses for at virke ætsende på øjnene. Ingen test nødvendig. Bør anses for øjenirriterende. Ingen test nødvendig.
	↓		
	Oplysninger foreligger ikke eller kan ikke danne grundlag for en konklusion		
	↓		
2	Foretag analyse af struktur/aktivitetrelationer for ætsende/irriterende virkning på øjnene Overvej struktur/aktivitetrelationer for hudætsning	Svære øjenskader må forventes Irritation af øjnene må forventes Må forventes at være hudætsende	Bør anses for at virke ætsende på øjnene. Ingen test nødvendig. Bør anses for øjenirriterende. Ingen test nødvendig. Bør anses for at virke ætsende på øjnene. Ingen test nødvendig.
	↓		
	Der kan ikke angives nogen forudsigelser, forudsigelserne kan ikke danne grundlag for en konklusion, eller forudsigelserne er negative		
	↓		
3	pH måles (bufferkapacitet, hvis det er relevant)	pH ≤ 2 eller ≥ 11,5 (med høj bufferkapacitet, hvis det er relevant)	Bør anses for at virke ætsende på øjnene. Ingen test nødvendig.
	↓		
	2 < pH < 11,5, eller pH ≤ 2,0 eller ≥ 11,5 med ringe eller ingen bufferkapacitet, hvis det er relevant		
	↓		

	Aktivitet	Resultat	Konklusion
4	Overvej eksisterende data for systemisk toksicitet ved optagelse gennem huden	Stærkt toksisk ved de koncentrationer, som vil blive anvendt ved test i øjet.	Kemikaliet for toksisk til at kunne testes. Ingen test nødvendig.
	↓		
	Oplysninger herom foreligger ikke, eller kemikaliet er ikke ret toksisk		
	↓		
5	Potentielle hudætsende egenskaber vurderes eksperimentelt ifølge teststrategien i kapitel B.4 i dette bilag, hvis der er lovkrav om dette	Ætsende eller stærkt irriterende respons	Bør anses for at virke ætsende på øjnene. Ingen yderligere test nødvendig.
	↓		
	Kemikaliet virker ikke ætsende eller stærkt irriterende på huden		
	↓		
6	Udfør en eller flere validerede og anerkendte in vitro- eller ex vivo-øjentest	Ætsende eller stærkt irriterende respons Irritationsrespons Ikke-irritationsrespons	Kemikaliet må antages at være ætsende eller stærkt irriterende for øjnene, hvis testen kan bruges til at identificere ætsende/stærkt irriterende kemikalier, og kemikaliet ligger inden for testens anvendelsesområde. Ingen yderligere test nødvendig. Kemikaliet må antages at være irriterende for øjnene, hvis testen kan bruges til at identificere ætsende, stærkt irriterende eller irriterende kemikalier korrekt, og kemikaliet ligger inden for testens anvendelsesområde. Ingen yderligere test nødvendig. Kemikaliet må antages ikke at være irriterende for øjnene, hvis testen kan bruges til at identificere ikke-irriterende kemikalier korrekt og korrekt skelne disse fra kemikalier, som er irriterende, stærkt irriterende eller ætsende for øjnene, og kemikaliet ligger inden for testens anvendelsesområde. Ingen yderligere test nødvendig.
	↓		
	En eller flere validerede og anerkendte in vitro- eller ex vivo-øjentest kan ikke danne grundlag for en konklusion		
	↓		
7	Udfør en indledende in vivo-øjentest i en kanin	Svær øjenskade	Bør anses for at virke ætsende på øjnene. Ingen yderligere test nødvendig.
	↓		
	Ingen alvorlige skader eller ingen respons		
	↓		

	Aktivitet	Resultat	Konklusion
8	Udfør kontroltest i yderligere et eller to dyr.	Ætsende eller irriterende	Må anses for at virke ætsende eller irriterende på øjnene. Ingen yderligere test nødvendig.
		Ikke ætsende eller irriterende	Må anses for ikke at virke irriterende eller ætsende på øjnene. Inden yderligere test nødvendig.

LITTERATUR

- (1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161-177.
- (4) Kapitel B.4 i dette bilag, Akut hudirritation/-ætsning.
- (5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. In Vitro, 2, 19-26.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, 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, pp. 483-524.
- (7) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227-231.
- (8) Supplement til kapitel B.4 i dette bilag: Sekventiel testningsstrategi for hudirritation og ætsning.
- (9) Kapitel B.40 i dette bilag, *In vitro*-hudætsning: måling af transkutan elektrisk modstand (TER).
- (10) Kapitel B.40.A i dette bilag, *In vitro*-hudætsning: test med human hudmodel.
- (11) OECD (2006), Test No. 435: *In vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.
- (12) Kapitel B.47 i dette bilag, Forsøgsmetode til påvisning af oksecornea-uklarhed og -permeabilitet (BCOP-forsøgsmetoden) til identifikation af i) kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade, og ii) kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade.
- (13) Kapitel B.48 i dette bilag, Isoleret kyllingeøje-forsøgsmetoden (ICE-forsøgsmetoden) til identifikation af i) kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade, og ii) kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade.

3) Del B, kapitel B.10, affattes således:

»B.10 *In vitro*-test for kromosomaberrationer i celler fra pattedyr

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline) 473 (2016). Den er en del af en række forsøgsmetoder vedrørende genetisk toksikologi. Der er udarbejdet et OECD-dokument med kortfattede oplysninger om test af genetisk toksikologi og en oversigt over de nylige ændringer af denne testvejledning (1).

Formålet med *in vitro*-testen for kromosomaberrationer er at påvise, om et kemikalie eller andet forårsager strukturelle kromosomafvigelse i dyrkede pattedyrceller (2) (3) (4). Der er to typer strukturændringer, kromosomtypen og kromatidtypen. Polyploidi (herunder endofordobling) kan opstå i kromosomaberrationsassays *in vitro*. Selv om aneugener kan fremkalde polyploidi, er polyploidi alene ikke tegn på aneugenpotentiale og kan ganske enkelt være tegn på forstyrrelse eller cytotoxicitet af cellecyclussen (5). Denne test er ikke beregnet til at måle aneuploidi. En *in vitro*-mikrokernetest (6) anbefales til påvisning af aneuploidi.

I *in vitro*-testen for kromosomaberrationer kan der benyttes kulturer af etablerede cellelinjer eller primære cellekulturer af human oprindelse eller gnaveroprindelse. Cellerne bør udvælges på grundlag af deres vækstegenskaber ved dyrkning, karotypens stabilitet (herunder kromosomtal) og hyppighed af spontane kromosomaberrationer (7). På nuværende tidspunkt gør de tilgængelige data det ikke muligt at fremlægge konkrete anbefalinger, men viser, at det i forbindelse med vurdering af kemiske farer er vigtigt at tage højde for status af p53, genetisk (karotypens) stabilitet, DNA-reparationskapacitet og oprindelse (gnavere eller mennesker) af de celler, der er udvalgt til test. Brugere af denne forsøgsmetode opfordres således til at overveje, hvilken indflydelse disse og andre celleegenskaber har på, hvordan en cellelinje kan afsløre induktion af kromosomafvigelse, da der hele tiden fremkommer ny viden på dette område.

De anvendte definitioner er forklaret i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

Normalt kræver en *in vitro*-test, at der benyttes en eksogen metabolisk aktivering, medmindre cellerne er metabolisk kompetente i forhold til testkemikalierne. Metabolismeaktiveringssystemet efterligner ikke fuldstændigt *in vivo*-forholdene. Man bør omhyggeligt undgå betingelser, der kunne føre til et artefakt positivt resultat, dvs. kromosomskade, der ikke skyldes direkte interaktion mellem testkemikallet og kromosomer. Disse betingelser omfatter ændringer i pH eller osmolalitet (8) (9) (10), interaktion med mediets komponenter (11) (12) eller for højt cytotoxicitetsniveau (13) (14) (15) (16).

Denne test bruges til at registrere kromosomaberrationer, som kan hidrøre fra klastogene hændelser. Analysen af induktion af kromosomaberrationer bør foretages ved hjælp af celler i metafase. Det er derfor vigtigt, at celler bør opnå mitose i både behandlede og ubehandlede kulturer. For fremstillede nanomaterialer kan der være behov for særlige tilpasninger af denne forsøgsmetode, men disse er ikke beskrevet i denne forsøgsmetode.

Før forsøgsmetoden bruges på en blanding for at generere data til lovgivningsmæssige anvendelsesformål, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.

PRINCIP FOR TESTEN

Cellekulturer fra mennesker eller andre pattedyr eksponeres for testkemikaliet både med og uden en eksogen metabolisk aktivering, medmindre der anvendes celler med en tilstrækkelig metaboliseringssevne (jf. punkt 13). Efter passende forud fastsatte tidsrum efter starten af eksponeringen for testkemikaliet behandles kulturerne med et metafasestandsende kemikalie (f.eks. colcemid eller colchicin), hvorefter de høstes og farves; dernæst undersøges metafasecellerne mikroskopisk for forekomst af aberration af kromatidtypen og kromosomtypen.

BESKRIVELSE AF METODEN

Forberedelser*Celler*

Der kan benyttes en række forskellige cellelinjer (f.eks. ovarie fra kinesisk hamster (CHO), lunge fra kinesisk hamster V79, lunge fra kinesisk hamster (CHL)/IU, TK6) eller primære cellekulturer, herunder perifere blodlymfocytter fra mennesker eller andre pattedyr (7). Valget af anvendte cellelinjer bør begrundes videnskabeligt. Når der anvendes primære celler, bør det af hensyn til dyrevelfærden overvejes at anvende primære celler fra mennesker, hvis det er muligt, og disse bør indsamles i overensstemmelse med menneskelige etiske principper og regler. Perifere blodlymfocytter fra mennesker bør udtages fra unge (ca. 18-35 år), ikkerygende personer uden kendt sygdom eller nylige eksponeringer for genotoksiske stoffer (f.eks. kemikalier, ioniserende stråling) i et niveau, der vil øge baggrundsforekomsten af kromosomaberrationer. Det vil sikre en lav og konsekvent baggrundsforekomst af kromosomaberrationer. Den grundlæggende forekomst af kromosomaberrationer stiger med alderen, og denne tendens er mere markant hos kvinder end hos mænd (17) (18). Hvis celler fra mere end en donor pooles, bør antallet af donorer angives. Det er nødvendigt at påvise, at cellerne er delt fra begyndelsen af behandlingen med testkemikaliet til prøveudtagning. Cellekulturer fastholdes i en eksponentiel cellevækstfase (cellelinjer) eller stimuleres til at dele sig (primære kulturer af lymfocytter) for at eksponere cellerne på forskellige stadier i celleyklusen, da cellefasernes følsomhed over for testkemikalierne muligvis ikke kendes. De primære celler, der skal stimuleres med mitogenstoffer for at dele sig, synkroniseres generelt ikke længere under eksponering for testkemikaliet (f.eks. humane lymfocytter efter en 48-timers stimulering med mitogen). Det anbefales ikke at bruge synkroniserede celler under behandlingen, men det kan accepteres, såfremt det er berettiget.

Medier og dyrkningsbetingelser

Til vedligeholdelse af kulturerne bør der benyttes egnede dyrkningsmedier og inkubationsbetingelser (dyrkningsflasker, fugtig atmosfære på 5 % CO₂, hvor det er relevant, inkubationstemperatur på 37 °C). Cellelinjer bør kontrolleres regelmæssigt for et stabilt normalt kromosomtal og fravær af mykoplasma kontaminering (7) (19), og i tilfælde af kontaminering, eller hvis det normale kromosomtal har ændret sig, bør cellerne ikke anvendes. Den normale cyklustid for de cellelinjer eller primære kulturer, der benyttes i laboratoriet, bør være fastlagt og være i overensstemmelse med de offentliggjorte celleegenskaber (20).

Fremstilling af kulturer

Cellelinjer: Celler udtages fra stamkulturer og udsås i dyrkningsmedium med en sådan tæthed, at cellerne i suspension eller i encellede lag vil fortsætte med at vokse eksponentielt, indtil de høstes (f.eks. bør konfluens undgås for celler, der vokser i encellede lag).

Lymfocytter: Fuldblod, der er behandlet med antikoaguleringsmiddel (f.eks. heparin), eller fraseparerede lymfocytter dyrkes (f.eks. i 48 timer for humane lymfocytter) med tilstedeværelse af et mitogen [f.eks. phytohemagglutinin (PHA) for humane lymfocytter] for at fremkalde celledeling inden eksponering for testkemikaliet.

Metabolisk aktivering

Eksogene metaboliserende systemer bør anvendes, når der gøres brug af celler med utilstrækkelige endogene metaboliske egenskaber. Det mest almindeligt anvendte system, der som standard anbefales, medmindre der er begrundelse for andet, er en cofaktorsuppleret postmitokondriefraktion (S9), der fremstilles af leveren fra gnavere (normalt rotter), der har været behandlet med enzyminducerende stoffer såsom Aroclor 1254 (21) (22) (23) eller en blanding af phenobarbiton og β -naphthoflavon (24) (25) (26) (27) (28) (29). Sidstnævnte blanding er ikke i strid med Stockholmkonventionen om persistente organiske miljøgifte (30) og har vist sig at være lige så effektiv som Aroclor 25 til induktion af oxidaser med blandet funktion (24) (25) (26) (28). S9-fraktionen anvendes normalt i en koncentration på 1-2 % (v/v), men kan øges til 10 % (v/v) i det færdige testmedium. Brug af produkter, der nedsætter mitoseindekset, især calciumkompleksdannere (31), bør undgås under behandlingen. Valget af type og koncentration af exogent metabolismeaktiveringssystem eller anvendte metaboliske inducerende stoffer kan påvirkes af den testede kemikaliegruppe.

Præparering af testkemikali

Testkemikalier i fast form bør præpareres i passende opløsningsmidler og eventuelt fortyndes inden behandling af cellerne (jf. punkt 23). Testkemikalier i væskeform kan enten tilsættes direkte til testsystemet og/eller fortyndes inden behandlingen af testsystemet. Gasser og flygtige testkemikalier bør testes ved passende modifikation af standardprotokollerne, f.eks. i forseglede dyrkningsflasker (32) (33) (34). Der bør laves præparater af testkemikali

Testbetingelser

Opløsningsmidler

Opløsningsmidlet bør vælges for at optimere testkemikaliets opløselighed uden at påvirke assayets adfærd negativt, f.eks. ved at ændre cellevækst, påvirke integriteten af testkemikali

Måling af celleproliferation og cytotoxicitet og valg af behandlingskoncentrationer

Ved valg af højeste koncentration af testkemikali

Målinger af celleproliferation foretages for at sikre, at et passende antal af de behandlede celler har undergået mitose under testen, og at behandlingerne udføres med passende cytotoxicitet (jf. punkt 18 og 22). Cytotoxiciteten bør bestemmes med og uden metabolismeaktivering i hovedforsøget ved hjælp af en passende indikator for celledød og -vækst. Evaluering af cytotoxicitet i en indledende test kan være nyttig for at sikre en bedre definition af de koncentrationer, der skal anvendes i hovedforsøg, men en indledende test er ikke obligatorisk. Hvis en sådan test udføres, bør den ikke erstatte måling af cytotoxicitet i hovedforsøget.

Relativ populationsfordobling (RPD) eller relativ forøgelse af celletal (RICC) er passende metoder til vurdering af cytotoxicitet i cytogenetiske test (13) (15) (35) (36) (55) (jf. formlerne i tillæg 2). I tilfælde af langtidsbehandling og prøveudtagning efter et tidsrum, der svarer til 1,5 gange normal cellecykluslængde regnet fra behandlingens begyndelse (dvs. længere end 3 cellecykluslængder i alt), kan anvendelsen af RPD føre til, at cytotoxiciteten undervurderes (37). Under disse omstændigheder kan RICC være et bedre mål, eller evaluering af cytotoxicitet efter 1,5 gange normal cellecykluslængde kunne være et nyttigt estimat ved brug af RPD.

For lymfocytter i primærkulturer er mitoseindekset (MI) et mål for cytotoxisk/cytostatisk virkning, men påvirkes af, hvor længe efter behandlingen det måles, det anvendte mitogen og mulige forstyrrelser af cellecyklussen. MI er imidlertid acceptabelt, da andre cytotoxicitetsmålinger kan være både besværlige og upraktiske og ikke nødvendigvis gælder for målpopulationen af lymfocytter, der vokser som reaktion på PHA-stimulering.

Mens RICC og RPD for cellelinjer og MI for primærkulturer af lymfocytter er de anbefalede cytotoxicitetsparametre, kan andre indikatorer (f.eks. celleintegritet, apoptose, nekrose, cellecyklus) give nyttige supplerende oplysninger.

Mindst tre testkoncentrationer (herunder ikke opløsningsmiddel og positive kontroller), der opfylder acceptkriterierne (passende cytotoxicitet, antal celler mv.), bør vurderes. Uanset hvilke typer celler (cellelinjer eller primærkulturer af lymfocytter), det drejer sig om, kan der ved hver af de testede koncentrationer anvendes enten replikater eller enkelte behandlede kulturer. Selv om det anbefales at benytte duplikate kulturer, accepteres anvendelse af enkeltkulturer også, forudsat at det samme totale celleantal scores i enten enkeltkulturer eller dublikate kulturer. Brug af enkeltkulturer er især relevant ved vurdering af mere end tre koncentrationer (jf. punkt 31). De resultater, der er opnået i uafhængige replikater i en given koncentration, kan samles med henblik på dataanalyse (38). For testkemikalier, der udviser ringe eller ingen cytotoxicitet, vil koncentrationsintervaller på ca. 2 til 3 gange normalt være egnede. Hvis der forekommer cytotoxicitet, bør de valgte testkoncentrationer dække et interval fra det, der frembringer cytotoxicitet som beskrevet i punkt 22, til koncentrationer, hvor der er en beskeden og ringe eller ingen cytotoxicitet. Mange testkemikalier udviser kraftige koncentration/respons-kurver, og for at indhente data ved lav og moderat cytotoxicitet eller undersøge dosis/respons-forholdet nærmere vil det være nødvendigt at bruge mere samlede koncentrationer og/eller mere end tre koncentrationer (enkeltekulturer eller replikater), navnlig i situationer, hvor der er behov for at gentage forsøget (jf. punkt 47).

Hvis den højeste koncentration er baseret på cytotoxicitet, bør den højeste koncentration sigte mod at opnå 55 ± 5 % cytotoxicitet ved hjælp af de anbefalede cytotoxicitetsparametre (dvs. reduktion af RICC og RPD for cellelinjer og reduktion af MI for primærkulturer af lymfocytter til 45 ± 5 % af den sideløbende negative kontrol). Man bør være omhyggelig med at fortolke positive resultater, der kun findes i den høje ende af dette cytotoxicitetsområde på 55 ± 5 % (13).

For tungtopløselige testkemikalier, der ikke er cytotoxiske ved koncentrationer, der er lavere end den laveste uopløselige koncentration, bør den højeste analyserede koncentration producere uklarheder eller bundfald, som er synligt med det blotte øje eller ved hjælp af et inverteret mikroskop efter afslutningen af behandlingen med testkemikallet. Selv om der forekommer cytotoxicitet over den laveste uopløselige koncentration, tilrådes det at gennemføre testen ved kun en koncentration, der frembringer uklarhed eller synligt bundfald, fordi artefakte virkninger kan skyldes bundfaldet. Ved den koncentration, der frembringer bundfald, bør det omhyggeligt sikres, at bundfaldet ikke griber forstyrrende ind i udførelsen af testen (f.eks. farvning eller scoring). Det kan være nyttigt at bestemme opløseligheden i dyrkningsmediet inden forsøget.

Hvis der ikke observeres bundfald eller begrænsende cytotoxicitet, bør testkoncentrationen højst være 10 mM, 2 mg/ml eller 2 µl/ml (den laveste af de tre) (39) (40) (41). Hvis testkemikaliets sammensætning ikke er defineret, f. eks. et stof af ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer (UVCB) (42), miljømæssige udtræk mv., kan der være behov for at øge den højeste koncentration (f.eks. 5 mg/ml) ved manglende tilstrækkelig cytotoxicitet for at øge koncentrationen af hver af komponenterne. Det bør dog bemærkes, at disse krav kan variere for humanlægemidler (43).

Kontroller

Der bør i hver høst indgå samtidige negative kontrolprøver (jf. punkt 15), hvor behandlingsmediet kun består af opløsningsmiddel, og som behandles på samme måde som de øvrige kulturer.

Der skal foretages samtidige positive kontroller for at påvise, at laboratoriet er i stand til at identificere klastogener i henhold til testprotokollen og effektiviteten af det exogene metabolismeaktiveringssystem, hvor det er relevant. Eksempler på positive kontroller er anført i tabel 1 nedenfor. Alternative positive kontrollkemikalier kan anvendes, hvis der er belæg for det. Fordi in vitro-test af pattedyrceller for genetisk toksicitet er tilstrækkeligt standardiserede, kan brug af positive kontroller begrænses til et klastogen, som kræver metabolisk aktivering. Forudsat at det sker samtidig med den ikke-aktiverede test med samme behandlingsvarighed, vil den positive kontrolrespons påvise både aktiviteten i metabolismeaktiveringssystemet og testsystemets reaktionsevne. Langtidsbehandling (uden S9) bør dog have sin egen positive kontrol, da behandlingens varighed er forskellig fra testen med metabolismeaktivering. Hver positiv kontrol bør anvendes ved en eller flere koncentrationer, der forventes at give reproducerbare og påviselige forøgelse i forhold til baggrundsværdierne for at påvise testsystemets følsomhed (dvs. virkningerne er tydelige, uden at de kodede objektglas' identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser dem), og responsen bør ikke bringes i fare på grund af cytotoxicitet, der overskrider de grænser, der er fastsat i forsøgsmetoden.

Tabel 1.

Anbefalede referencekemikalier til vurdering af laboratoriets kompetence og udvælgelse af positive kontroller.

Kategori	Kemikalie	CAS-registrerings-nummer
1. Aktive klastogener uden metabolisk aktivering		
	Methylmethansulfonat	66-27-3
	Mitomycin C	50-07-7
	4-Nitroquinolin-N-Oxid	56-57-5
	Cytosinarabinosid	147-94-4
2. Klastogener, som kræver metabolisk aktivering		
	Benzo(a)pyren	50-32-8
	Cyclofosfamid	50-18-0

FREM GANGSMÅDE

Behandling med testkemikalie

Celler under formering behandles med testkemikallet med og uden tilstedeværelse af et metabolismeaktiveringssystem.

Høst af kulturer

For at opnå en grundig evaluering, hvilket er en forudsætning for at kunne konkludere, at resultatet er negativt, bør alle tre følgende forsøgsbetingelser udføres med en kortvarig behandling med og uden metabolisk aktivering og langtidsbehandling uden metabolisk aktivering (jf. punkt 43, 44 og 45):

- Cellerne bør eksponeres for testkemikaliet uden metabolismeaktivering i 3-6 timer, og der udtages en prøve efter et tidsrum, der svarer til ca. 1,5 gange cellecykluslængden, regnet fra behandlingens begyndelse (18).
- Cellerne bør eksponeres for testkemikaliet med metabolismeaktivering i 3-6 timer, og der udtages en prøve efter et tidsrum, der svarer til ca. 1,5 gange cellecykluslængden, regnet fra behandlingens begyndelse (18).
- Celler bør kontinuerligt eksponeres uden metabolisk aktivering indtil prøveudtagning efter et tidsrum, der svarer til ca. 1,5 gange normal cellecykluslængde. Nogle kemikalier (f.eks. nukleosidanaloger) er lettere at bestemme ved behandlings-/prøveudtagningstider på mere end 1,5 gange cellecykluslængden (24).

I tilfælde af, at en af ovenstående forsøgsbetingelser fører til et positivt svar, er det muligvis ikke nødvendigt at undersøge nogen af de andre behandlinger.

Præparering af kromosomer

Cellekulturerne behandles med colcemid eller colchicin normalt 1-3 timer før høst. Høst og kromosompræparering skal foregå særskilt for hver enkelt kultur. Kromosompræpareringen består i hypotonisk behandling af cellerne, fiksering og farvning (1). I encellede lag kan der være mitotiske celler (runde celler, der er løsrevet fra overfladen) til stede efter eksponeringen på 3-6 timer. Da disse mitotiske celler let løsriveres, kan de gå tabt, når mediet med testkemikaliet fjernes. Hvis der er grund til at tro, at der sker en betydelig stigning i antallet af mitotiske celler i forhold til kontrollerne, hvilket er tegn på sandsynlig mitosestandsnings, bør cellerne indsamles ved centrifugering og gentilsættes kulturerne for ikke at miste celler, der er i mitose, og hvor der er risiko for kromosomaberration på høsttidspunktet.

Analyse

Alle objektglas, herunder fra positive og negative kontrolprøver, bør kodes uafhængigt inden mikroskopering for kromosomaberrationer. Da fikseringen ofte medfører, at en del af metafasecellerne går i stykker, og kromosomerne går tabt, bør scorede celler indeholde et antal centromerer svarende til kromosomtallet ± 2 .

Mindst 300 velpræparerede metafaser bør scores pr. koncentration og kontrol, for at det kan konkluderes, at et testkemikalie er klart negativt (jf. punkt 45). De 300 celler bør fordeles ligeligt mellem replikaterne, når der benyttes replikate kulturer. Benyttes enkeltkulturer pr. koncentration (jf. punkt 21), bør mindst 300 velpræparerede metafaser scores i denne enkeltkultur. Scoring af 300 celler har den fordel, at testens statistiske power øges, og desuden ses nulværdier sjældent (forventes at være blot 5 %) (44). Antallet af bedømte metafaser kan reduceres, hvis der observeres store mængder celler med kromosomaberrationer, og testkemikaliet anses for at være tydeligt positivt.

Celler med strukturelle kromosomaberrationer med og uden gaps bør scores. Brud og gaps er defineret i tillæg 1 i henhold til (45) (46). Aberrationer af kromatid- og kromosomtypen bør registreres særskilt og klassificeres i undertyper (brud, udveksling). De procedurer, der anvendes i laboratoriet, bør sikre, at analyser af kromosomaberrationer udføres af veluddannede bedømmere og eventuelt underkastes peer review.

Selv om testens formål er at påvise ændringer i kromosomstrukturen, er det vigtigt også at notere frekvensen af polyploid og endofordobling, hvis dette konstateres (jf. pkt. 2).

Laboratoriets kompetencer

For at få tilstrækkelig erfaring med testen, før den tages i brug til rutinetest, bør laboratoriet have udført en række forsøg med positive referencekemikalier, som virker via forskellige mekanismer, og forskellige negative kontroller (ved hjælp af forskellige opløsningsmidler/bærestoffer). Disse positive og negative kontrolresponsen bør være i overensstemmelse med litteraturen. Dette gælder ikke for laboratorier, der har opsamlet erfaring, dvs. som har en historisk database til rådighed som defineret i punkt 37.

Et udvalg af positive kontrolkemikalier (jf. tabel 1 i punkt 26) bør undersøges med korte og lange behandlinger uden metabolismeaktivering samt med kort behandling med metabolismeaktivering med henblik på at kunne påvise evnen til at spore klastogene kemikalier og vurdere effektiviteten af metabolismeaktiveringssystemet. Der bør vælges en række koncentrationer af de udvalgte kemikalier, som giver en reproducerbar og koncentrationsafhængig stigning over baggrunden for at påvise testsystemets følsomhed og dynamiske rækkevidde.

Historiske kontroldata

Laboratoriet bør fastlægge:

- et historisk positivt kontrolområde og en historisk positiv kontrolfordeling
- et historisk negativt (ubehandlet, opløsningsmiddel) kontrolområde og en historisk positiv kontrolfordeling.

Når der første gang indhentes data til en historisk negativ kontrolfordeling, bør de samtidige negative kontroller stemme overens med offentliggjorte kontroldata, hvis sådanne findes. Efterhånden som der tilføjes flere eksperimentelle data til kontrolfordelingen, bør de samtidige negative kontroller ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af denne fordeling (44) (47). Laboratoriets database over historiske negative kontroller bør i første omgang opbygges med mindst 10 forsøg, men fortrinsvis bestå af mindst 20 forsøg udført under sammenlignelige forsøgsbetingelser. Laboratorierne bør anvende kvalitetskontrolmetoder som f.eks. kontrolkort (f. eks. C-diagrammer eller X-søjlediagrammer (48)) til at fastslå, hvor variable deres positive og negative kontroldata er, samt vise, at metodologien er "under kontrol" i deres laboratorium (44). Yderligere anbefalinger til, hvordan man opbygger og anvender de historiske data (dvs. kriterier for optagelse og udelukkelse af historiske data og acceptkriterier for et givent forsøg), kan findes i litteraturen (47).

Der bør tages hensyn til eventuelle ændringer af forsøgsprotokollen med hensyn til, om de stemmer overens med laboratoriets eksisterende historiske kontroldata. Ved større uoverensstemmelser bør der etableres en ny historisk kontroldatabase.

Negative kontroldata bør bestå af forekomsten af celler med kromosomaberrationer fra en enkeltkultur eller summen af replikate kulturer som beskrevet i punkt 21. Sideløbende negative kontroller bør ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af fordelingen af laboratoriets historiske negative kontroldata (44) (47). Såfremt data fra sideløbende negative kontroller falder uden for kontrolgrænsen på 95 %, kan de eventuelt optages i den historiske kontrolfordeling, så længe disse data ikke er ekstreme afvigende værdier, og der er dokumentation for, at testsystemet er "under kontrol" (jf. punkt 37) og for, at der ikke er begået tekniske eller menneskelige fejl.

DATA OG RAPPORTERING

Præsentation af resultaterne

Den procentdel af cellerne, som har en eller flere strukturelle kromosomaberrationer, bør vurderes. Aberrationer af kromatid- og kromosomtypen klassificeret ved undertyper (brud, udvekslinger) bør anføres særskilt med antal og hyppighed for forsøgs- og kontrolkulturer. Gaps registreres og oplyses særskilt, men medregnes ikke i den totale aberrationshyppighed. Procentdelen af polyploidi og/eller endofordoblede celler rapporteres, når den ses.

Sideløbende målinger af cytotoksicitet for alle behandlede, negative og positive kontrolkulturer i hovedforsøget bør ligeledes registreres.

Der anføres data for hver enkelt kultur. Desuden sammenfattes alle data i tabelform.

Acceptkriterier

Accept af en test er baseret på følgende kriterier:

- Den sideløbende negative kontrol anses for at kunne føjes til laboratoriets historiske negative kontrolldatabase som beskrevet i punkt 39.
- Sideløbende positive kontroller (jf. punkt 26) bør fremkalde responser, der er forenelige med responserne i den historiske positive kontrolldatabase, og medføre en statistisk set signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.
- Celleproliferationskriterier i opløsningsmiddelkontrollen bør være opfyldt (punkt 17 og 18).
- Alle tre forsøgsbetingelser blev testet, medmindre en af dem gav positive resultater (jf. punkt 28).
- Tilstrækkeligt antal analyserbare celler og koncentrationer (punkt 31 og 21).
- Kriterierne for valg af højeste koncentration er i overensstemmelse med kriterierne i punkt 22, 23 og 24.

Evaluering og fortolkning af resultater

Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis følgende er opfyldt i en af de undersøgte forsøgsbetingelser (jf. punkt 28):

- a) Mindst en af testkoncentrationerne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.
- b) Stigningen er dosisafhængig, når den evalueres med en passende trend test.
- c) Et eller flere af resultaterne ligger uden for fordelingen af de historiske negative kontrolldata (f.eks. Poisson-baserede kontrolgrænser på 95 %, jf. punkt 39).

Når alle disse kriterier er opfyldt, anses testkemikaliets for at kunne fremkalde kromosomaberrationer i de dyrkede pattedyrceller i dette testsystem. Anbefalinger til de mest hensigtsmæssige statistiske metoder kan findes i litteraturen (49) (50) (51).

Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart negativt, hvis følgende er opfyldt i alle de undersøgte forsøgsbetingelser (jf. punkt 28):

- a) Ingen af testkoncentrationerne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.

- b) Der indtræder ikke en koncentrationsafhængig stigning, når der foretages en evaluering med en passende trend test.
- c) Alle resultaterne ligger inden for fordelingen af de historiske negative kontroldata (f.eks. Poisson-baserede kontrolgrænser på 95 %, jf. punkt 39).

Testkemikaliet anses derefter for ikke at kunne fremkalde kromosomaberrationer i de dyrkede pattedyrceller i dette testsystem.

Der er ikke krav om verifikation af en klart positiv eller negativ respons.

Hvis responsen hverken er klart negativ eller positiv som beskrevet ovenfor eller for at bidrage til at fastslå den biologiske relevans af et resultat, bør dataene evalueres af eksperter, og/eller der bør foretages yderligere undersøgelser. Scoring af yderligere celler (hvor det er relevant) eller et nyt forsøg, eventuelt med ændrede forsøgsbetingelser (f.eks. koncentrationsinterval, andre metabolismeaktiveringsbetingelser (dvs. S9-koncentration eller S9-oprindelse) kan være nyttigt.

I sjældne tilfælde, selv efter yderligere undersøgelser, giver dataene ikke mulighed for at konkludere, om resultaterne er positive eller negative; konklusionen er derfor, at testkemikalieresponsen er tvetydig.

En forøgelse i antallet af polyploide celler kan være tegn på, at testkemikaliet er i stand til at inhibere mitoseprocesser og fremkalde kromosomantalsaberrationer (52). En forøgelse af antallet af celler med endofordoblede kromosomer kan være tegn på, at testkemikaliet kan inhibere celleyklusens forløb (53) (54) (jf. punkt 2). Forekomsten af polyploide celler og celler med endofordoblede kromosomer bør derfor registreres særskilt.

Testrapport

Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

- oprindelse, batchnummer, frist for anvendelse, hvis dette foreligger
- testkemikaliets stabilitet, hvis dette er kendt
- testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet, hvis dette er kendt
- måling af pH-værdi, osmolalitet og bundfald i det dyrkningsmedium, hvortil kemikaliet blev tilsat, hvor det er relevant.

Stof med kun en bestanddel:

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

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

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

Opløsningsmiddel:

- begrundelse for valg af opløsningsmiddel
- procentdelen af opløsningsmiddel i det endelige dyrkningsmedium bør også angives.

Celler:

- celletype og oprindelse
- den valgte celletypes karyotypiske karakteristika og egnethed
- fravær af mycoplasma for cellelinjer
- for cellelinjer, oplysninger om cellecyklussens længde, fordoblingstid eller proliferationsindeks
- bloddonorerens køn, alder og andre relevante oplysninger om donor, fuldblod eller fraseparerede lymfocytter, benyttet mitogen
- eventuelt antal passager for cellelinjer
- eventuelle metoder til opbevaring af cellekulturer for cellelinjer
- normalt kromosomtal for cellelinjer.

Testbetingelser:

- det metafasestandsende kemikalies betegnelse og koncentration og varigheden af cellernes eksponering for stoffet
- testkemikaliets koncentration udtrykt som endelig koncentration i dyrkningsmediet (f.eks. µg eller mg/ml eller mM af dyrkningsmediet)
- begrundelse for valg af koncentrationer og antal kulturer, herunder f.eks. cytotoxicitetsdata og opløselighedsbegrænsninger
- substratsammensætning og eventuel CO₂-koncentration, fugtighedsniveau
- koncentration (og/eller volumen) af opløsningsmiddel og tilsat testkemikalie i dyrkningsmediet
- inkubationstemperatur
- inkubationstid
- behandlingens varighed
- høsttidspunkt efter behandling
- celletæthed ved udsåning, hvis det er relevant
- metabolismeaktiveringssystemets type og sammensætning (kilde for S9, metode til fremstilling af S9-sammensætning, koncentration eller rumfang af S9-blanding og S9 i det endelige dyrkningsmedium, kvalitetskontrol af S9)
- positive og negative kontrolkemikalier, endelige koncentrationer for hver behandlingsbetingelse
- anvendte metoder til præparering af objektglas og farvningsteknik
- kriterier for accept af assays
- kriterier for scoring af aberrationer
- antal analyserede metafaser
- metoder til måling af cytotoxicitet
- eventuelle supplerende oplysninger vedrørende cytotoxicitet og anvendt metode
- kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig
- anvendte metoder til bestemmelse af pH, osmolalitet og bundfald.

Resultater:

- antal behandlede celler og antal høstede celler for hver kultur, når der benyttes cellelinjer
- cytotoxicitetsmålinger, f.eks. RPD, RICC, MI og eventuelt andre observationer
- oplysninger om celleyklussens længde, fordoblingstid eller proliferationsindeks for cellelinjer
- tegn på bundfald og tidspunkt for bestemmelse
- definitioner af aberrationer, herunder gaps
- antal scorede celler, antal celler med kromosomaberrationer og typen af disse, anført særskilt for hver behandlet kultur og kontrolkultur med og uden gaps
- eventuelt observerede ploidændringer (polyploide celler og celler med endofordoblede kromosomer, anført særskilt)
- koncentration/respons-sammenhængen, når det er muligt
- sideløbende negative (opløsningsmiddel) og positive kontrolprøver (koncentrationer og opløsningsmidler)
- historisk negative (opløsningsmiddel) og positive kontroldata med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser og kontrolgrænser på 95 % for fordelingen, samt mængden af data
- statistiske analyser og eventuelle P-værdier.

*Diskussion af resultater**Konklusioner*

LITTERATUR

- (1) OECD, "Draft Introduction to the OECD guidelines on genetic toxicology testing and guidance on the selection and application of assays", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment. Under preparation.
- (2) Evans, H.J. (1976), "Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens", in *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.
- (3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), "The *in vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture" in *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. *et al.* (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York- Oxford, pp. 427-432.
- (4) Galloway, S.M. *et al.* (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.
- (5) Muehlbauer, P.A. *et al.* (2008), Improving dose selection and identification of aneugens in the *in vitro* chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, pp. 318-327.
- (6) Kapitel B.49 i dette bilag: *In vitro-mikrokernetest i pattedyrceller*.
- (7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.
- (8) Scott, D. *et al.* (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol.257/2, pp. 147-204.

-
- (9) Morita, T. *et al.* (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, pp. 297-305.
- (10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789-886.
- (11) Long, L.H. *et al.* (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 Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/1-2, pp. 177-183.
- (12) Nessler, F. *et al.* (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, pp. 439-452.
- (13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 191-201.
- (14) Kirkland, D. *et al.* (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 Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 584/1-2, pp. 1-256.
- (15) Greenwood, S. *et al.* (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, pp. 36-44.
- (16) Hilliard, C.A. *et al.* (1998), Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, pp. 316-326.
- (17) Hedner K. *et al.* (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, Vol. 62, pp. 305-309.
- (18) Ramsey M.J. *et al.* (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, Vol. 338, pp. 95-106.
- (19) Coecke S. *et al.* (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, pp. 261-287.
- (20) Henderson, L. *et al.* (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol.12/3, pp. 163-167.
- (21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, pp. 347-363.
- (22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.
- (23) Natarajan, A.T. *et al.* (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 Research*, Vol. 37/1, pp. 83-90.
- (24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, pp. 277-290.
- (25) 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, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, pp. 55-65.

- (26) Elliot, B.M. *et al.* (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, pp. 175-177.
- (27) Matsushima, T. *et al.* (1976), "A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al.* (eds.), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (28) Galloway, S.M. *et al.* (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 241-261.
- (29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 28/1, pp. 51-59.
- (30) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Tilgængelig på: <http://www.pops.int/>.
- (31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 190/3, pp. 225-8.
- (32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), "CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids", in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.
- (33) Zamora, P.O. *et al.* (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.
- (34) Asakura, M. *et al.* (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.
- (35) Lorge, E. *et al.* (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 655/1-2, pp. 1-3.
- (36) Galloway, S. *et al.* (2011), Workshop summary: Top concentration for *in vitro* mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for *in vitro* cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 77-83.
- (37) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 724/1-2, pp. 86-87.
- (38) Richardson, C. *et al.* (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.
- (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) ENV/JM/TG(2014)17. Tilgængelig på anmodning.
- (40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (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 Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1-2, pp. 32-56.
- (41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Muagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36-43.

- (42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, <http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt>.
- (43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Tilgængelig på: <https://federalregister.gov/a/2012-13774>.
- (44) OECD (2014), Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.
- (45) ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.
- (46) Scott, D. *et al.* (1990), "Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*", in *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 62-86.
- (47) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.
- (48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.
- (49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.
- (50) Galloway, S.M. *et al.* (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.
- (51) Richardson, C. *et al.* (1989), "Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays", in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two *in vitro* mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 29-46.
- (53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, Vol. 119/3, pp. 403-413.
- (54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin — induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, Vol. 43/3, pp. 1362-1364.
- (55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 312, pp. 139-149.
-

Tillæg 1

DEFINITIONER

Aneuploidi: Enhver afvigelse fra det normale diploide (eller haploide) kromosomtallet af et eller flere kromosomer, men ikke af et eller flere komplette kromosomsæt (polyploidi).

Apoptose: Programmeret celledød karakteriseret ved en række trin, der forårsager opløsning af celler i membranbundne partikler, som herefter elimineres ved fagocytose eller afstødning.

Celleproliferation: Forøgelse af celleantal som følge af mitotisk celledeling.

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

Kromatidbrud: Diskontinuitet i et enkelt kromatid, hvor der er en tydelig forskydning af en af kromatiderne.

Kromatidgap: Region uden farvning (akromatisk læsion) af et enkeltkromatid, hvor der er minimal forskydning af kromatidet.

Aberration af kromatidtypen: Beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på enkeltkromatider eller brud på og sammenføjning af kromatider.

Aberration af kromosomtypen: Beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på — eller brud på og sammenføjning af — begge kromatider på samme sted.

Klastogen: Alle stoffer eller processer, der forårsager strukturelle kromosomaberrationer i populationer af celler eller organismer.

Koncentrationer: Henviser til endelige koncentrationer af testkemikalien i dyrkningsmediet.

Cytotoksicitet: For de assays, som er omfattet af denne forsøgsmetode ved hjælp af cellelinjer, identificeres cytotoksicitet som en reduktion i den relative populationsfordobling (RPD) eller den relative forøgelse af celletal (RICC) i de behandlede celler sammenlignet med den negative kontrol (jf. punkt 17 og tillæg 2). For de assays, som er omfattet af denne forsøgsmetode ved hjælp af primære kulturer af lymfocytter, identificeres cytotoksicitet som en reduktion i mitoseindekset (MI) i de behandlede celler sammenlignet med den negative kontrol (jf. punkt 18 og tillæg 2).

Endofordobling: En proces, hvorved cellekernen efter en S-fase i DNA-replikationen ikke fortsætter over i mitosen, men påbegynder endnu en S-fase. Resultatet er kromosomer med 4, 8, 16, ... kromatider.

Genotoksisk: Et generelt udtryk, der omfatter alle former for DNA- eller kromosombeskadigelse, herunder brud, deletioner, addukter, ændringer af nukleotider og koblinger, omlejninger, genmutationer, kromosomaberrationer og aneuploidi. Det er ikke alle former for genotoksiske virkninger, der forårsager mutationer eller stabil kromosomskade.

Mitoseindeks (MI): Forholdet mellem antallet af celler i metafase og det samlede antal celler i en population; viser populationens formeringsgrad.

Mitose: Deling af cellekernen, der normalt inddeles i profase, prometafase, metafase, anafase og telofase.

Mutagen: Forårsager arvelige ændringer af DNA-baseparsekvens(er) i gener eller i kromosomstrukturen (kromosomaberrationer).

Antalsaberration: Ændring af kromosomtallet i forhold til det for de pågældende celler normale antal.

Polyploidi: Antalsmæssige kromosomaberrationer i celler eller organismer, der involverer et eller flere komplette kromosomsæt, men ikke et enkelt kromosom eller kromosomer (aneuploidi).

p53-status: p53-protein indgår i celleyklusregulering, apoptose og DNA-reparation. Celler, der mangler funktionelt p53-protein, og som ikke kan standse celleyklussen eller eliminere beskadigede celler via apoptose eller andre mekanismer (f.eks. induktion af DNA-reparation), som vedrører p53-funktioner som reaktion på DNA-beskadigelse, bør teoretisk set være mere modtagelige for genmutationer eller kromosomaberrationer.

Relativ forøgelse af celletal (RICC): Forøgelse af celletallet i kemisk eksponerede kulturer i forhold til forøgelsen i ubehandlede kulturer udtrykt i procent.

Relativ populationsfordobling (RICC): Forøgelse af antallet af populationsfordoblinger i kemisk eksponerede kulturer i forhold til forøgelsen i ubehandlede kulturer udtrykt i procent.

S9-leverfraktion: Supernatant fra leverhomogenat efter 9 000 g centrifugering, dvs. ekstrakt fra rå lever.

S9-blanding: Blanding af S9-leverfraktionen og andre medvirkende faktorer, som er nødvendige for at skabe metabolisk enzymaktivitet.

Opløsningsmiddelkontrol: Generelt begreb, der angiver de kontrolkulturer, som kun modtager det opløsningsmiddel, der anvendes til at opløse testkemikaliet.

Strukturel ændring: Ændring i kromosomstrukturen, som kan iagttages ved mikroskopi i celledelingens metafase i form af deletioner og fragmenter, intrachange og interchange.

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

Ubehandlede kontroller: Kulturer, der ikke modtager behandling (dvs. hverken testkemikalie eller opløsningsmiddel), men behandles sideløbende på samme måde som de kulturer, der modtager testkemikaliet.

Tillæg 2

FORMLER FOR VURDERING AF CYTOTOKSICITET

Mitoseindeks (MI):

$$\text{MI}(\%) = \frac{\text{Number of mitotic cells}}{\text{Total number of Cells scored}} \times 100$$

Relativ forøgelse af celletal (RICC) eller **relativ populationsfordobling (RPD)** anbefales, da der ved begge metoder tages højde for den andel af cellepopulationen, som har delt sig.

$$\text{RICC}(\%) = \frac{(\text{Increase in number of cells in treated cultures}(\text{final-starting}))}{(\text{Increase in numbers of cells in control cultures}(\text{final-starting}))} \times 100$$

$$\text{RPD}(\%) = \frac{(\text{No. of Population doublings in treated cultures})}{(\text{No. of population doublings in control cultures})} \times 100$$

hvor:

Populationsfordobling = $[\log (\text{celleantal efter behandling} \div \text{oprindeligt celleantal})] \div \log 2$

En RICC eller RPD på 53 % viser f.eks. 47 % cytotoxicitet/cytostase, og 55 % cytotoxicitet/cytostase målt ved MI betyder, at det faktiske MI er 45 % af kontrollen.

Under alle omstændigheder bør antallet af celler inden behandling måles, og det samme gør sig gældende for behandlede og negative kontrolkulturer.

Selv om RCC (dvs. antal celler i behandlede kulturer/antal celler i kontrolkulturer) tidligere er blevet brugt som cytotoxicitetsparameter, anbefales dette ikke længere, da cytotoxiciteten kan undervurderes.

I de negative kontrolkulturer bør populationsfordobling være kompatibel med kravet om at tage prøver af celler efter behandlingen på et tidspunkt svarende til ca. 1,5 gange længden af den normale cellecyklus, og mitoseindekset bør være højt nok til at få et tilstrækkeligt antal celler i mitose og til at kunne beregne en reduktion på 50 % pålideligt.«

4) Del B, kapitel B.11, affattes således:

»B.11 Test for kromosomaberrationer i knoglemarv hos pattedyr

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline) 475 (2016). Den er en del af en række forsøgsmetoder vedrørende genetisk toksikologi. Der er udarbejdet et OECD-dokument med kortfattede oplysninger om test af genetisk toksikologi og en oversigt over de nylige ændringer af denne testvejledning (1).

In vivo-testen for kromosomaberrationer i knoglemarv hos pattedyr er navnlig relevant ved vurdering af genotoksicitet, da faktorer for in vivo-metabolisme, farmakokinetik og DNA-reparationsprocesser er aktive og bidrager til responserne, selv om de kan være forskellige fra art til art. En in vivo-test er ligeledes nyttig til yderligere undersøgelse af genotoksicitet, der er påvist ved en in vitro-test.

In vitro-testen for kromosomaberrationer hos pattedyr benyttes til at påvise, om et testkemikalie forårsager strukturelle kromosomafvigelser i knoglemarvceller hos dyr, normalt gnavere (2) (3) (4) (5). Der er to typer aberrationer af kromosomstrukturen, kromosomtypen og kromatidtypen. De fleste genotoksiske aberrationer er af kromatidtypen, men også aberrationer af kromosomtypen forekommer. Beskadigelse af kromosomer og lignende er årsag til mange genetiske sygdomme hos mennesker, og meget tyder på, at disse læsioner og lignende, som ændrer på onkogene og tumorsuppressorgener i somatiske celler, medvirker til induktion af kræft hos mennesker og i forsøgssystemet. Polyploidi (herunder endofordobling) kan opstå i kromosomaberrationsassays in vivo. En stigning i polyploidi alene er imidlertid ikke tegn på aneugenpotentiale og kan ganske enkelt være tegn på forstyrrelse eller cytotoxicitet af celcyklussen. Denne test er ikke beregnet til at måle aneuploidi. En in vivo-test for mikrokerner i erythrocytter hos pattedyr (kapitel B.12 i dette bilag) eller en in vitro-test for mikrokerner i celler hos pattedyr (kapitel B.49 i dette bilag) vil være henholdsvis den in vivo- og in vitro-test, som anbefales til påvisning af aneuploidi.

Definitioner af den anvendte terminologi findes i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

Der anvendes rutinemæssigt gnavere i denne test, men andre arter kan i visse tilfælde være hensigtsmæssige, såfremt det er videnskabeligt begrundet. Knoglemarv er målvævet i denne test, da det er et væv med høj vaskularisation, der består af celler med kort cyklustid, som er lette at isolere og behandle. Den videnskabelige begrundelse for at bruge andre arter end rotter og mus bør anføres i rapporten. Hvis der anvendes andre arter end gnavere, anbefales det at integrere målingen af kromosomaberrationer i knoglemarv i en anden passende toksicitetstest.

Hvis der er grund til at tro, at testkemikalien eller dets metabolit(ter) ikke vil nå frem til målvævet, er denne test ikke egnet.

Før brug af forsøgsmetoden til lovmæssig test af en blanding til generering af data bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.

PRINCIPPET FOR FORSØGSMETODEN

Dyrene eksponeres for testkemikalien på passende vis og aflives humanitært på passende tidsrum efter eksponeringen. Inden aflivningen behandles dyrene med et metafasestandsende stof (f.eks. colchicin eller colcemid). Der fremstilles derefter præparater af knoglemarvceller, som farves, og metafasecellerne undersøges for kromosomaberrationer.

KONTROL AF LABORATORIETS KOMPETENCE

Kompetenceundersøgelser

For at få tilstrækkelig erfaring med udførelsen af assayet, inden det anvendes til rutinetest, bør laboratoriet have påvist, at det kan frembringe de forventede resultater ud fra de offentliggjorte data (f.eks. (6)) for hyppigheden af kromosomaberrationer med mindst to positive kontrolkemikalier (herunder svag respons fremkaldt af lave doser af positive kontroller) som dem, der er anført i tabel 1, og med compatible bærestof-/opløsningsmiddelkontroller (jf. punkt 22). Til disse forsøg bør der anvendes doser, der giver reproducerbare og dosisrelaterede stigninger og påviser testsystemets følsomhed og dynamiske interval i det relevante væv (knoglemarv) ved hjælp af den scoringsmetode, som skal anvendes i laboratoriet. Dette krav gælder ikke for laboratorier, der har erfaring, dvs. som har en historisk database til rådighed som defineret i punkt 10-14.

Historiske kontrolldata

I løbet af kompetenceundersøgelserne bør laboratoriet fastlægge:

- et historisk positivt kontrolområde og en historisk positiv kontrolfordeling og
- et historisk negativt kontrolområde og en historisk negativ kontrolfordeling.

Når der første gang indhentes data til en historisk negativ kontrolfordeling, bør de samtidige negative kontroller stemme overens med offentliggjorte kontrolldata, hvis sådanne findes. Efterhånden som der tilføjes flere forsøgsdata til den historiske kontrolfordeling, bør de samtidige negative kontroller ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af denne fordeling. Laboratoriets historiske negative kontroldatabase bør være så statistisk robust, at laboratoriet kan vurdere fordelingen af deres negative kontrolldata. Ifølge litteraturen kan det være nødvendigt at foretage mindst 10 forsøg, men det foretrækkes at foretage mindst 20 forsøg udført under sammenlignelige forsøgsbetingelser. Laboratorierne bør anvende kvalitetskontrolmetoder som f.eks. kontrolkort (f.eks. C-diagrammer eller X-søjlediagrammer (7)) til at identificere, hvor variable deres kontrolldata er, samt vise, at metodologien er "under kontrol" i deres laboratorium. Yderligere anbefalinger til, hvordan man opbygger og anvender de historiske data (dvs. kriterier for optagelse og udelukkelse af historiske data og acceptkriterier for et givent forsøg), kan findes i litteraturen (8).

Såfremt laboratoriet ikke gennemfører et tilstrækkeligt antal forsøg for at fastlægge en statistisk robust negativ kontrolfordeling (jf. punkt 11) under kompetenceundersøgelserne (beskrevet i punkt 9), kan det accepteres at opbygge fordelingen under de første rutinetest. Denne fremgangsmåde bør følge anbefalingerne i litteraturen (8), og de negative kontrolresultater, der opnås i disse forsøg, bør stemme overens med de offentliggjorte negative kontrolldata.

Der bør tages hensyn til eventuelle ændringer af forsøgsprotokollen med hensyn til, om de påvirker resultaterne på en måde, der stemmer overens med laboratoriets eksisterende historiske kontroldata. Kun store uoverensstemmelser bør føre til, at der etableres en ny historisk kontroldatabase, hvor eksperter vurderer, at den adskiller sig fra den tidligere fordeling (jf. punkt 11). Under genetableringen er der muligvis ikke behov for en fuldstændig negativ kontroldatabase for at give mulighed for at foretage en faktisk test, hvis laboratoriet kan påvise, at deres sideløbende negative kontrolværdier forbliver enten forenelige med deres tidligere database eller med de tilsvarende offentliggjorte data.

Negative kontrolldata bør bestå af forekomsten af aberrationer i kromosomernes struktur (dog ikke gaps) hos hvert enkelt dyr. Sideløbende negative kontroller bør ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af fordelingen af laboratoriets historiske negative kontroldatabase. Såfremt data fra sideløbende negative kontroller falder uden for kontrolgrænsen på 95 %, kan de eventuelt optages i den historiske kontrolfordeling, så længe disse data ikke er ekstreme afvigende værdier, og der er dokumentation for, at testsystemet er "under kontrol" (jf. punkt 11) og for, at der ikke er begået tekniske eller menneskelige fejl.

BESKRIVELSE AF METODEN

Forberedelser

Valg af dyreart

Der bør anvendes raske unge voksne dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Der anvendes sædvanligvis rotter, men mus kan også anvendes. En hvilken som helst anden pattedyrsart kan anvendes, hvis dette begrundes videnskabeligt i rapporten.

Miljø og fodringsbetingelser

Temperaturen i dyrerummet bør for gnavere være 22 °C ($\pm$ 3 °C). Den relative luftfugtighed bør ideelt set være 50-60 %, dog mindst 40 % og helst ikke over 70 % bortset fra under rengøring af rummet. Belysningen bør være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke. For så vidt angår fodring, kan der anvendes konventionelt laboratorieføde med ubegrænset adgang til vand. Valget af føde kan påvirkes af behovet for at sikre en passende iblanding af et testkemikalie, når dette indgives ad denne vej. Gnavere bør opbevares i små grupper (højst fem dyr pr. bur) af samme køn og behandlingsgruppe, såfremt der ikke forventes aggressiv adfærd, fortrinsvist i solide gulvbure med passende miljøberigelse. Dyr bør kun opbevares individuelt, hvis dette er sagligt begrundet.

Klargøring af dyrene

Der anvendes normalt sunde unge voksne dyr (for gnavere ideelt set 6-10 uger gamle ved behandlingens start, selv om lidt ældre dyr også accepteres), som fordeles tilfældigt i kontrol- og behandlingsgrupperne. De enkelte dyr identificeres unikt ved hjælp af en human og minimalt invasiv metode (f.eks. med ring, mærke, mikrochip eller biometrisk identifikation, men ikke øre- eller tåklipning) og akklimatiseres til laboratoriebetingelserne i mindst fem dage. Burene indrettes på en sådan måde, at de mulige følger af burets placering minimeres. Krydskontaminering af den positive kontrol og testkemikallet bør undgås. Ved undersøgelsens start bør variationen i dyrenes vægt være minimal og ikke overstige $\pm$ 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn.

Fremstilling af doser

Faste testkemikalier opløses eller suspenderes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer eller iblandes føde eller drikkevand før indgivelse i dyrene. Flydende testkemikalier kan indgives direkte eller opløses før indgivelse. Til inhalationseksponering kan testkemikalier indgives som gas, damp eller en fast/flydende aerosol, afhængigt af deres fysisk-kemiske egenskaber. Der bør anvendes friske præparater af testkemikallet, medmindre stabilitetsdata påviser, at opbevaring er acceptabelt, og hensigtsmæssige opbevaringsbetingelser bør defineres.

Opløsningsmiddel/bærestof

Opløsningsmidlet/bærestoffet må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke mistænkes for at reagere kemisk med testkemikallet. Hvis der anvendes andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, bør deres anvendelse understøttes af referencedata om deres kompatibilitet. Det anbefales så vidt muligt først at overveje at anvende vandige opløsningsmidler/bærestoffer. Eksempler på almindeligt anvendte kompatible opløsningsmidler/bærestoffer omfatter vand, fysiologisk saltvand, methylcelluloseopløsning, saltopløsning af carboxymethylcellulosenatrium, olivenolie og majsolie. I fravær af historiske eller offentliggjorte kontrolldata, der viser, at et valgt atypisk opløsningsmiddel/bærestof ikke frembringer strukturelle aberrationer eller andre skadelige virkninger, bør der foretages en indledende undersøgelse for at fastlægge, om opløsningsmiddel-/bærestofkontrollen kan accepteres.

Kontroller

Positive kontroller

Hver test bør normalt omfatte en gruppe dyr, der behandles med et positivt kontrollkemikalie. Dette krav kan fraviges, hvis testlaboratoriet har påvist, at det er kompetent til at udføre testen og har fastlagt et historisk positivt kontrolområde. Såfremt der ikke indgår en sideløbende positiv kontrolgruppe, bør hvert enkelt forsøg omfatte scoringskontroller (fikserede og ufarvede objektglas). Disse kan opnås ved i scoringen af undersøgelsen at inkludere passende referenceprøver, som er hentet og opbevaret fra et særskilt positivt og periodisk udført kontrollforsøg (f. eks. hver 6.-18. måned) i det laboratorium, hvor testen udføres, f.eks. under kompetencetest og derefter regelmæssigt, hvor det er nødvendigt.

Positive kontrollkemikalier bør frembringe en påviselig forøgelse af celler med strukturelle kromosomaberrationer over det spontane niveau. Der bør vælges sådanne doser i de positive kontrolprøver, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede prøvers identitet umiddelbart afsløres for den, der bedømmer dem. Det kan accepteres, at den positive kontrol administreres på anden vis end testkemikaliets ved hjælp af et andet behandlingsprogram, eller at prøveudtagningen kun forekommer på et bestemt tidspunkt. Hvis det er hensigtsmæssigt, bør der anvendes kemisk beslægtede positive kontrollkemikalier. Eksempler på positive kontrollkemikalier findes i tabel 1.

Tabel 1

Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrollkemikalier

Kemikalie	CAS-registreringsnummer
Ethylmethansulfonat	62-50-0
Methylmethansulfonat	66-27-3
Ethylnitrosourinstof	759-73-9
Mitomycin C	50-07-7
Cyclophosphamidmonohydrat	50-18-0 (6055-19-2)
Triethylenmelamin	51-18-3

Negative kontroller

Dyr i den negative kontrolgruppe bør inkluderes på alle prøveudtagningstidspunkter og ellers håndteres på samme måde som behandlingsgrupperne, bortset fra at de ikke behandles med testkemikaliets. Hvis der anvendes et opløsningsmiddel/bærestof til administrering af testkemikaliets, bør kontrolgruppen modtage dette opløsningsmiddel/bærestof. Hvis der imidlertid konstant påvises forskelle mellem dyrene og hyppige forekomster af celler med strukturelle aberrationer i de historiske negative kontroldata på alle prøveudtagningstidspunkter for testlaboratoriet, er det muligvis kun nødvendigt med en enkelt prøveudtagning til den negative kontrol. Såfremt der bruges en enkelt prøveudtagning til negative kontroller, bør det være det første prøveudtagningstidspunkt, der anvendes i undersøgelsen.

FREMGANGSMÅDE

Dyrenes antal og køn

Generelt er mikrokernerresponsen ens mellem han- og hundyr (9), og dette ventes også at være tilfældet for strukturelle kromosomaberrationer. De fleste undersøgelser kan derfor udføres hos begge køn. Data, der påviser relevante forskelle mellem han- og hundyr (f.eks. forskelle i systemisk toksicitet, metabolisme, biotilgængelighed, knoglemarvstoksicitet mv., herunder en forprøve til bestemmelse af dosisinterval), vil tilskynde til, at begge køn anvendes. I så fald kan det være hensigtsmæssigt at foretage en undersøgelse hos begge køn, f.eks. som led i en toksicitetsundersøgelse med gentagen dosering. Det kan være hensigtsmæssigt at benytte faktormodellen, hvis begge køn anvendes. Oplysninger om, hvordan dataene analyseres med denne model, findes i tillæg 2.

Gruppernes størrelse ved undersøgelsens start bør fastlægges for at få mindst fem analyserbare dyr af samme køn eller af hvert køn, hvis begge anvendes, pr. gruppe. Hvis eksponeringen af mennesker for det kemiske stof er kønsspecifik, som det f.eks. er tilfældet med visse farmaceutiske stoffer, bør testen udføres med det pågældende køn. Vejledende vil en undersøgelse af knoglemarv med to prøveudtagningstidspunkter og tre dosisgrupper og en sideløbende negativ kontrolgruppe samt en positiv kontrolgruppe (hvor hver gruppe består af fem dyr af samme køn) typisk højst kræve 45 dyr.

Dosisniveauer

Hvis der gennemføres en forprøve til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger egnede data, der kan bruges til at vælge dosis, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme, køn og behandlingsmåde, som agtes benyttet i hovedundersøgelsen (10). Formålet med undersøgelsen bør være at identificere den højst tolererede dosis (MTD) defineret som den højeste dosis, som tolereres uden dokumentation for undersøgelsesbegrænsende toksicitet i forhold til varigheden af undersøgelsesperioden (f.eks. ved at fremkalde et fald i kropsvægt eller cytotoxicitet i det hæmatopoietiske system), men ikke død eller tegn på smerte eller lidelse, der kræver human aflivning (11).

Højeste dosis kan også defineres som en dosis, der i nogen grad udviser tegn på toksicitet i knoglemarven.

Kemikalier, der udviser mætning af toksikokinetiske egenskaber eller fremkalder afgiftningsprocesser, der kan føre til et fald i eksponeringen efter en lang behandling, kan være undtagelser fra kriterierne om dosisfastsættelse og bør vurderes fra gang til gang.

For at opnå dosis/respons-oplysninger bør en fuldstændig undersøgelse omfatte en negativ kontrolgruppe og mindst tre dosisniveauer generelt adskilt af en faktor på 2, men ikke højere end 4. Hvis testkemikaliets ikke frembringer toksicitet i en forprøve eller baseret på eksisterende data, bør den højeste dosis for en enkelt indgivelse være 2 000 mg/kg kropsvægt. Hvis testkemikaliets imidlertid frembringer toksicitet, bør MTD være den højeste administrerede dosis, og de anvendte dosisniveauer bør fortrinsvist dække et interval fra maksimum til en dosis, der frembringer ringe eller ingen toksicitet. Når der observeres toksicitet i målvævet (knoglemarven) på alle de testede dosisniveauer, tilrådes det at foretage yderligere undersøgelser ved ikke-toksiske doser. Undersøgelser, der skal give en mere fuldstændig karakteristik af de kvantitative dosis/respons-oplysninger, kan kræve yderligere dosisgrupper. For visse typer testkemikalier (f.eks. humanlægemidler), som er omfattet af særlige krav, kan disse grænser variere.

Grænsetest

Hvis dosisforprøver eller eksisterende data fra beslægtede dyrestammer viser, at en behandling med som minimum grænsedosis (beskrevet nedenfor) ikke frembringer observerbare toksiske virkninger (herunder ingen formindskelse af knoglemarvsproliferation eller andre tegn på målvævet cytotoxicitet), og hvis der ikke forventes genotoksicitet baseret på in vitro-genotoksicitetsundersøgelser eller data fra strukturelt beslægtede kemikalier, er det ikke nødvendigt med en fuldstændig undersøgelse med tre dosisniveauer, forudsat at det er påvist, at testkemikaliets når målvævet (knoglemarven). I så fald kan det være tilstrækkeligt med et enkeltdosisniveau ved grænsedosis. For en indgivelsesperiode på > 14 dage er grænsedosis 1 000 mg/kg kropsvægt/dag. For indgivelsesperioder på 14 dage eller derunder er grænsedosis 2 000 mg/kg kropsvægt/dag.

Indgivelse af doser

Den forventede indgivelsesmåde for mennesker bør overvejes i forbindelse med udformningen af et assay. Andre indgivelsesmåder såsom føde, drikkevand, topisk, subkutan, intravenøst, oralt (med sonde), inhalation, intratrachealt eller implantation kan vælges, hvis de kan begrundes. Under alle omstændigheder bør der vælges en indgivelsesmåde, der sikrer tilstrækkelig eksponering af målvævet. Intraperitoneal injektion anbefales generelt ikke, eftersom det ikke er en tilsigtet metode til human eksponering og kun bør anvendes med en specifik saglig begrundelse. Hvis testkemikaliet iblandes føde eller drikkevand, navnlig med hensyn til enkeltdosering, bør det sikres, at tidsforskellen mellem indtagelse af føde og drikkevand og prøveudtagning er tilstrækkelig stor til, at virkningerne kan påvises (jf. punkt 33-34). Hvor stor en væskemængde der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Denne mængde må normalt højst være 1 ml/100 g kropsvægt, bortset fra vandige opløsninger, hvor der højst kan anvendes 2 ml/100 g kropsvægt. Anvendelse af større mængder bør begrundes. Bortset fra lokalirriterende eller ætsende testkemikalier, som normalt vil frembringe kraftigere virkninger ved højere koncentrationer, bør testmængden variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så indgivelsen sker ved samme mængde i forhold til kropsvægt ved alle dosisniveauer.

Behandlingsplan

Testkemikalier indgives normalt som en enkelt behandling, men kan indgives som to deldoser (dvs. to eller flere behandlinger samme dag med kun 2-3 timers interval), hvorved det bliver lettere at indgive en større mængde. Under disse omstændigheder, eller når kemikaliet indgives ved inhalation, bør prøveudtagningstidspunktet planlægges på grundlag af tidspunktet for den seneste indgivelse eller ved slutningen af eksponeringen.

Der findes kun begrænsede data om, hvorvidt en protokol med gentagne doser er egnet til denne test. I de tilfælde, hvor det er ønskeligt at integrere denne test med en toksicitetstest med gentagne doser, bør det imidlertid sikres, at mitotiske celler med kromosomskader ikke går tabt, sådan som det kan forekomme med toksiske doser. En sådan integration kan accepteres, når den højeste dosis er større end eller svarer til grænsedosis (jf. punkt 29), og en dosisgruppe indgives grænsedosis under hele behandlingsperioden. Mikrokernetesten (forsøgsmetode B.12) bør ses som den valgte in vivo-test for kromosomaberrationer, når der ønskes integration med andre undersøgelser.

Der udtages knoglemarvsprøver på to tidspunkter efter enkeltbehandling. For gnavnere bør det første prøveudtagningsinterval være den tid, som er nødvendig til at gennemføre 1,5 normal cellecykluslængde (idet sidstnævnte normalt følger 12-18 timer efter behandlingsperioden). Da det optimale tidspunkt for påvisning af kromosomaberrationer kan afhænge af, hvor lang tid der er påkrævet for optagelse og metabolisme af testkemikaliet, og af testkemikaliets indvirkning på cellecyklussens kinetik, anbefales det at udtage endnu en prøve 24 timer efter den første. Ved første prøveudtagning bør alle dosisgrupper behandles, og der bør udtages prøver med henblik på analyse. Ved de(n) senere prøveudtagning(er) er det imidlertid kun den højeste dosis, som skal indgives. Indgives stoffet over mere end en dag baseret på en saglig begrundelse, bør der generelt blot udtages en prøve, når der er gået 1,5 normal cellecykluslængde efter den sidste behandling.

Efter behandlingen og inden prøveudtagningen injiceres dyrene intraperitonealt med en passende dosis af et metafasestandsende stof (f.eks. colcemid eller colchicin), og efter et passende interval udtages der derefter prøver. For mus er dette interval ca. 3-5 timer inden prøveudtagningen, og for rotter er det 2-5 timer. Cellerne høstes fra knoglemarven, lades svulme op, fikseres og farves og analyseres for kromosomaberrationer (12).

Observationer

Der bør foretages generelle kliniske observationer af forsøgsdyrene, og de kliniske tegn bør registreres mindst en gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er) hver dag og under hensyntagen til det tidspunkt, hvor de forventede virkninger efter dosering toppe. Alle dyr bør observeres mindst to gange dagligt i doseringsperioden for morbiditet og dødelighed. Alle dyr bør vejes ved undersøgelsens start mindst en gang om ugen i undersøgelser med gentagen dosering og ved aflivning. Ved undersøgelser af mindst en uges varighed bør foderindtag måles mindst en gang ugentligt. Hvis testkemikallet indgives via drikkevandet, måles vandindtaget ved hvert vandskift og mindst en gang ugentligt. Dyr, der udviser ikkedødelig indikation for høj toksicitet, bør aflives humanitært før testperiodens udløb (11).

Eksponering af målvæv

Der bør på passende tidspunkt(er) tages en blodprøve for at gøre det muligt at undersøge plasmaniveauet i testkemikallet med henblik på at påvise, at der er sket eksponering af knoglemarven, hvor der er grundlag for dette, og hvor der ikke findes andre eksponeringsdata (jf. punkt 44).

Knoglemarvs- og kromosompræparater

Umiddelbart efter aflivningen udtages knoglemarvsceller fra dyrets lårben og skinneben, og disse eksponeres for hypotonisk væske og fikseres. Metafasecellerne udstryges derefter på objektglas og farves ved hjælp af etablerede metoder (jf. (3) (12)).

Analyse

Alle objektglas, herunder fra positive og negative kontroller, bør kodes selvstændigt inden analyse og randomiseres, så bedømmeren ikke er bekendt med eksponeringsbetingelserne.

Mitoseindekset bestemmes som udtryk for cytotoxiciteten i mindst 1 000 celler pr. dyr for alle behandlede dyr (inkl. positive kontroldyr), ubehandlede eller bærestof-/opløsningsmiddelnegative kontroldyr.

For hvert dyr bør der analyseres mindst 200 metafaser for strukturelle kromosomaberrationer med og uden gaps (6). Hvis den historiske negative kontroldatabase imidlertid viser, at den gennemsnitlige baggrundsfrekvens for strukturel kromosomaberration er $< 1\%$ i testlaboratoriet, bør det overvejes at score flere celler. Aberrationer af kromatid- og kromosomtypen bør registreres særskilt og klassificeres i undertyper (brud, udveksling). De procedurer, der anvendes i laboratoriet, bør sikre, at analyser af kromosomaberrationer udføres af veluddannede bedømmere og eventuelt underkastes peer review. Da præpareringen af objektglas ofte medfører, at en del af metafasecellerne går i stykker og kromosomerne dermed går tabt, bør scorede celler indeholde et antal centromerer på mindst $2n \pm 2$, hvor n er haploidtallet for kromosomer af den pågældende art.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

Individuelle dyredata fremlægges i tabelform. For hvert dyr registreres mitoseindekset, antallet af scorede metafaseceller, antallet af aberrationer pr. metafasecelle og den procentdel af cellerne, der har kromosomaberrationer. Forskellige typer strukturelle kromosomaberrationer bør anføres med antal og hyppighed for behandlingsgrupper og kontrolgrupper. Forekomsten af gaps samt polyploide celler og celler med endofordoblede kromosomer registreres særskilt. Frekvensen for gaps anføres, men medtages generelt ikke i den samlede frekvens for strukturel aberration. Hvis der ikke er tegn på forskellig respons hos de to køn, kan dataene samles med henblik på statistisk analyse. Data om dyretoksicitet og kliniske tegn bør også anføres.

Acceptkriterier

Følgende kriterier bestemmer, om testen kan accepteres:

- a) De sideløbende negative kontroldata anses for at kunne føjes til laboratoriets historiske negative kontrolldatabase (jf. punkt 11-14).
- b) Sideløbende positive kontroller eller scoringskontroller bør fremkalde responser, der er forenelige med responserne i den historiske positive kontrolldatabase, og medføre en statistisk set signifikant stigning sammenlignet med den negative kontrol (jf. punkt 20-21).
- c) Der er analyseret et passende antal doser og celler.
- d) Kriterierne for valg af højeste dosis er i overensstemmelse med kriterierne i punkt 25-28.

Evaluerer og fortolkning af resultater

Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis:

- a) Mindst en af behandlingsgrupperne viser en statistisk signifikant stigning i frekvensen af celler med strukturelle kromosomaberrationer (uden gaps) sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.
- b) Denne stigning er dosisafhængig på mindst et prøveudtagningstidspunkt, når den evalueres med en passende trend test.
- c) Et hvilken som helst af disse resultater ligger uden for fordelingen af de historiske negative kontrolldata (f.eks. Poisson-baserede kontrolgrænser på 95 %).

Hvis det kun er den højeste dosis, der undersøges på et bestemt prøveudtagningstidspunkt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis der er en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol, og resultaterne ligger uden for fordelingen af de historiske negative kontrolldata (f.eks. Poisson-baserede kontrolgrænser på 95 %). Anbefalinger til hensigtsmæssige statistiske metoder kan findes i litteraturen (13). Ved en dosis/respons-analyse bør mindst tre behandlede dosisgrupper analyseres. I de statistiske test bør dyret anvendes som forsøgseenhed. Positive resultater i testen for kromosomaberrationer viser, at testkemikalien fremkalder strukturelle kromosomaberrationer i den testede arts knoglemarv.

Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart negativt, hvis følgende er opfyldt i alle de undersøgte forsøgsbetingelser:

- a) Ingen af behandlingsgrupperne viser en statistisk signifikant stigning i frekvensen af celler med strukturelle kromosomaberrationer (uden gaps) sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.

- b) Der er ingen dosisrelateret stigning på noget prøveudtagningstidspunkt, når dette vurderes i en egnet trend test.
- c) Alle resultaterne ligger inden for fordelingen af de historiske negative kontroldata (f.eks. Poisson-baserede kontrolgrænser på 95 %).
- d) Knoglemarven blev eksponeret for testkemikaliet.

Anbefalinger til de mest hensigtsmæssige statistiske metoder kan findes i litteraturen (13). Dokumentation for knoglemarvens eksponering for et testkemikalie kan omfatte et fald i mitoseindekset eller måling af plasma eller blodniveauer for testkemikaliet eller testkemikalierne. I tilfælde af intravenøs indgivelse er der ikke behov for dokumentation for eksponering. Alternativt kan der anvendes ADME-data indsamlet i en uafhængig undersøgelse under anvendelse af den samme metode og de samme arter til påvise knoglemarvseksponering. Negative resultater viser, at testkemikaliet under testbetingelserne ikke fremkalder strukturelle kromosomaberrationer i den testede arts knoglemarv.

Der er ikke krav om verifikation af en klart positiv eller negativ respons.

Hvis responsen hverken er klart negativ eller positiv og for at bidrage til at fastslå den biologiske relevans af et resultat (f.eks. en svag eller usikker stigning), bør dataene evalueres af eksperter, og/eller der bør foretages yderligere undersøgelser af de afsluttede forsøg. I nogle tilfælde kan det være nyttigt at analysere flere celler eller foretage en ny undersøgelse under anvendelse af modificerede forsøgsbetingelser.

I sjældne tilfælde, selv efter yderligere undersøgelser, giver dataene ikke mulighed for at konkludere, om testkemikaliet fremkalder enten positive eller negative resultater, og konklusionen er derfor, at undersøgelsen er tvetydig.

Hyppigheden af polyploide og endofordoblede metafaser blandt de samlede metafaser bør registreres særskilt. En forøgelse af antallet af polyploide/endofordoblede celler kan være tegn på, at testkemikaliet kan inhibere mitotiske processer eller celleyklussens forløb (jf. punkt 3).

Testrapport

Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Resumé

Testkemikalie:

- oprindelse, batchnummer, frist for anvendelse, hvis dette foreligger
- testkemikaliets stabilitet, hvis kendt.

Stof med kun en bestanddel:

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

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

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

Præparering af testkemikaliet:

- begrundelse for valg af bærestof
- testkemikaliet opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet/bærestoffet, hvis dette er kendt
- fastlæggelse af sammensætning af føde, drikkevand eller inhalationsformulering
- analytiske bestemmelser af formuleringer (f.eks. stabilitet, homogenitet og nominelle koncentrationer), når de foretages.

Forsøgsdyr:

- anvendt art/stamme og begrundelse herfor
- dyrenes antal, alder og køn
- kilde, miljøbetingelser, føde mv.
- metode til entydig identifikation af dyr
- for korttidsundersøgelser: de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse og slutning; for undersøgelser af mere end en uges varighed: individuel kropsvægt under undersøgelsen og fødeindtagelse. Kropsvægtinterval, gennemsnit og standardafvigelse for hver enkelt gruppe bør medtages.

Testbetingelser:

- positive og negative (bærestof/opløsningsmiddel) kontrolgrupper
- data fra en eventuel forprøve til bestemmelse af dosisinterval
- begrundelse for valg af dosisniveau
- oplysninger om præparering af testkemikaliet
- oplysninger om indgivelse af testkemikaliet
- begrundelse for indgivelsesvej og -varighed
- metoder til kontrol af, at testkemikaliet eller testkemikalierne er nået frem til det almindelige kredsløb eller knoglemarven
- faktisk dosis (mg/kg kropsvægt/dag) beregnet på baggrund af testkemikaliet koncentration i foder/drikkevand (ppm) og forbrug, hvis relevant
- oplysninger om foder og vandkvalitet
- aflivningsmetode
- analgesimetode (hvis anvendt)
- detaljeret beskrivelse af behandling og prøveudtagningsplaner samt begrundelser for valg
- metoder til præparering af objektglas
- metoder til måling af toksicitet
- det metafasestandsende kemikalies identitet, koncentration, dosis og tidspunkt for indgivelse før prøveudtagning
- procedurer for isolering og bevaring af prøver
- kriterier for scoring af aberrationer

- antal analyserede metafaseceller pr. dyr og antal analyserede celler med henblik på mitoseindeksbestemmelse
- kriterier for accept af undersøgelsen
- kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller usikker.

Resultater:

- dyrenes tilstand før og i løbet af testperioden, herunder tegn på toksicitet
- mitoseindeks, anført særskilt for hvert dyr
- antal aberrationer og aberrationsceller og type, anført særskilt for hvert dyr
- samlet antal aberrationer pr. gruppe med gennemsnit og standardafvigelse
- antal celler med aberrationer pr. gruppe med gennemsnit og standardafvigelse
- eventuelt observerede ploidændringer, herunder frekvenser for polyploide og/eller endofordoblede celler
- dosis/respons-forhold, hvor muligt
- statistiske analyser og anvendt metode
- data for, at eksponering af knoglemarven fandt sted
- sideløbende negative og positive kontroldata med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser
- historisk negative og positive kontroldata med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser og kontrolgrænser på 95 % for fordelingen, samt tidsperiode og antal observationer
- opfyldte kriterier for en positiv eller negativ respons.

Diskussion af resultater.

Konklusion.

Referencer.

LITTERATUR

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Adler, I.D. (1984), "Cytogenetic Tests in Mammals", in Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, pp. 275-306.
- (3) Preston, R.J. *et al.* (1987), Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, Vol. 189/2, pp. 157-165.
- (4) Richold, M. *et al.* (1990), "In Vivo Cytogenetics Assays", in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D. J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.
- (5) Tice, R.R. *et al.* (1994), Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, Vol. 312/3, pp. 305-312.

- (6) Adler, I.D. *et al.* (1998), Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 417/1, pp. 19-30.
 - (7) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
 - (8) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87-90.
 - (9) Hayashi, M. *et al.* (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.
 - (10) Fielder, R.J. *et al.* (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.
 - (11) OECD (2000), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, N°19, OECD Publishing, Paris.
 - (12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, Methods in Molecular Biology, Vol. 1044, pp. 147-163.
 - (13) Lovell, D.P. *et al.* (1989), "Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays", in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.
-

Tillæg 1

DEFINITIONER

Aneuploidi: Enhver afvigelse fra det normale diploide (eller haploide) kromosomtallet af et eller flere kromosomer, men ikke af et eller flere komplette kromosomsæt (jf. polyploidi)

Centromer: Region(er) af et kromosom, hvortil tetrådene er påhæftet under celledeling, således at datterkromosomerne kan ordnes i forhold til dattercellernes poler.

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

Aberration af kromatidtypen: Beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på enkeltkromatider eller brud på og sammenføjning af kromatider.

Aberration af kromosomtypen: Beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på — eller brud på og sammenføjning af — begge kromatider på samme sted.

Endofordobling: En proces, hvorved cellekernen efter en S-fase i DNA-replikationen ikke fortsætter over i mitosen, men påbegynder endnu en S-fase. Resultatet er kromosomer med 4, 8, 16, ... kromatider.

Gap: En kromatisk beskadigelse, som er mindre end bredden af et kromatid, og hvor forskydningen af kromatiderne er minimal.

Mitoseindeks: Forholdet mellem antallet af celler i mitose og det samlede antal celler i en population, som er et mål for cellepopulationens spredning.

Antalsaberration: Ændring i kromosomtallet i forhold til det for de pågældende dyr normale antal (aneuploidi).

Polyploidi: Antalsmæssige kromosomaberrationer, der indebærer en ændring i antallet af det samlede kromosomsæt, i modsætning til en antalsmæssig ændring i en del af kromosomsættet (jf. aneuploidi).

Strukturel kromosomaberration: Ændring i kromosomstrukturen, som kan iagttages ved mikroskopi i celledelingens metafase i form af deletioner og fragmenter, intrachange og interchange.

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

Tillæg 2

FAKTORMODEL TIL IDENTIFIKATION AF KØNSBETINGEDE FORSKELLE I IN VIVO-KROMOSOMABERRATIONASSAYET**Faktormodellen og dens analyse**

I denne model testes mindst fem hanner og fem hunner på hvert koncentrationsniveau, hvilket betyder, at der med denne model anvendes mindst 40 dyr (20 hanner og 20 hunner plus relevante positive kontroller).

Modellen, som er en af de enklere faktormodeller, svarer til en tovejsanalyse af varians med køn og koncentration som de primære virkninger. Dataene kan analyseres ved hjælp af mange statistiske standardsoftwarepakker som SPSS, SAS, STATA, Genstat, samt under anvendelse af R.

Analysen opdeler variationen i datasættet i variationen mellem kønnene, mellem koncentrationerne og i relation til interaktionen mellem kønnene og koncentrationerne. Hvert forhold testes mod et estimat af variationen mellem replikate dyr inden for grupper af dyr af samme køn ved samme koncentration. Fuldstændige oplysninger om den underliggende metode fås i mange statistiske standardlærebøger (jf. referencer) og i hjælpefunktionerne i de statistiske pakker.

Analysen fortsætter med at undersøge interaktionen mellem køn og koncentration i ANOVA-tabellen ⁽¹⁾. Uden en væsentlig interaktion giver de kombinerede værdier på tværs af køn eller koncentrationsniveauer gyldige statistiske test mellem niveauerne baseret på den samlede gruppevariation i ANOVA-tabellen.

Analysen fortsætter med at opdele skønnet af variationen mellem koncentrationer i kontraster, som giver en test for lineære og kvadratiske kontraster mellem respons på tværs af koncentrationsniveauerne. Hvis der er en betydelig interaktion mellem køn og koncentration, kan denne interaktion også indeles i lineære kontraster x køn og kvadratiske kontraster x køn. Dette giver test af, om koncentrationsresponsen er parallelle for de to køn, eller om der er en differentieret respons mellem dem.

Skønnet over den samlede variation i gruppen kan bruges til parvise test af forskellen mellem medianer. Disse sammenligninger kan foretages mellem medianerne for de to køn og mellem medianerne for de forskellige koncentrationsniveauer såsom for sammenligninger med de negative kontrolniveauer. I de tilfælde hvor der er en væsentlig interaktion, kan der foretages sammenligninger mellem medianerne for de forskellige koncentrationer inden for samme køn eller medianerne for de to køn ved samme koncentration.

Referencer

Der findes mange statistiske lærebøger, som diskuterer teori, model, metode, analyse og fortolkning af faktormodeller, lige fra enkle to-faktor-analyser til de mere komplekse modeller, som anvendes ved Design of Experiment-metoder. Her følger en ikke-udtømmende liste. Nogle bøger indeholder bearbejdede eksempler på sammenlignelige modeller, i nogle tilfælde med en kode til at køre analyserne ved hjælp af forskellige softwarepakker.

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

⁽¹⁾ Statistikere, der anvender en modelleringsmetode såsom f.eks. lineære normale modeller (General Linear Models, GLM) kan have en anden, men sammenlignelig tilgang til analysen, men når ikke nødvendigvis frem til den traditionelle ANOVA-tabel, der er baseret på algoritmiske metoder til beregning af statistik udviklet før computerens indtog.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1997). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.»

5) Del B, kapitel B.12, affattes således:

»B.12 Test for mikrokerner i erythrocytter hos pattedyr

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline) 474 (2016). Den er en del af en række forsøgsmetoder vedrørende genetisk toksikologi. Der er udarbejdet et OECD-dokument med kortfattede oplysninger om test af genetisk toksikologi og en oversigt over de nylige ændringer af denne testvejledning (1).

In vivo-testen for mikrokerner hos pattedyr er navnlig relevant ved vurdering af genotoksicitet, da faktorer for in vivo-metabolisme, farmakokinetik og DNA-reparationsprocesser er aktive og bidrager til responserne, selv om de kan være forskellige fra art til art. En in vivo-test er ligeledes nyttig til yderligere undersøgelse af genotoksicitet, der er påvist ved en in vitro-test.

En in vivo-test for mikrokerner hos pattedyr anvendes til at påvise beskadigelse af kromosomerne eller mitoseapparatet hos erythroblaster forårsaget af testkemikaliet. Testen vurderer dannelsen af mikrokerner i de udtagne erythrocytter, enten i knoglemarven eller det perifere blod hos dyr, sædvanligvis gnavnere.

Formålet med mikrokernetesten er at påvise kemikalier, der forvolder cytogenetiske skader, som medfører dannelse af mikrokerner indeholdende enten tiloversblevne kromosomfragmenter eller hele kromosomer.

Når en erythroblast i knoglemarven udvikler sig til en umoden erythrocyt (kaldes til tider også polykromatisk erythrocyt eller reticulocyt), udstødes cellens hovedkerne, og en eventuel dannet mikrokjerne kan blive tilbage i cytoplasma. I disse celler er mikrokerner let synlige eller påviselige, da de ikke har en hovedkerne. Forøget forekomst af umodne erythrocytter med mikrokjerne hos behandlede dyr er tegn på inducerede strukturelle eller antalsmæssige kromosomaberrationer.

Nydannede erythrocytter med mikrokjerne identificeres og kvantificeres ved farvning efterfulgt af enten visuel scoring ved hjælp af et mikroskop eller automatiseret analyse. Optælling af et tilstrækkeligt antal umodne erythrocytter i perifert blod eller knoglemarv fra voksne dyr lettes betydeligt ved hjælp af en automatisk scoringsplatform. Sådanne platforme er acceptable som alternativer til manuel bedømmelse (2). Sammenlignende undersøgelser har vist, at sådanne metoder, ved hjælp af passende kalibreringsstandarder, kan give bedre reproducerbarhed i og mellem laboratorier og bedre følsomhed end manuel mikroskopisk bedømmelse (3) (4). Automatiske systemer, som kan måle frekvensen af erythrocytter med mikrokjerne, omfatter, men er ikke begrænset til, flowcytometre (5), billedanalyseplatforme (6) (7) og laserscanningcytometre (8).

Selv om det ikke normalt sker som en del af testen, kan kromosomfragmenter skelnes fra hele kromosomer ved en række kriterier, bl.a. om der er en kinetokor eller DNA-centromer til stede, hvilket er tegn på intakte kromosomer. Hvis der ikke er en kinetokor eller DNA-centromer til stede, indeholder mikrokernen kun fragmenter af kromosomer, mens tilstedeværende DNA-centromer indikerer kromosomtab.

Definitioner af den anvendte terminologi findes i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

Knoglemarven hos unge voksne gnave er målvævet for genetiske skader i denne test, idet erythrocytter produceres i dette væv. Måling af mikrokerner hos umodne erythrocytter i perifert blod er acceptabel hos andre pattedyr, hvor der er påvist tilstrækkelig følsomhed for påvisning af kemikalier, der forårsager strukturelle eller antalsmæssige kromosomaberrationer i disse celler (ved induktion af mikrokerner i umodne erythrocytter), og hvor der foreligger en videnskabelig begrundelse. Det vigtigste endepunkt er hyppigheden af umodne erythrocytter med mikrokerner. Hyppigheden af modne erythrocytter med mikrokerner i det perifere blod kan også benyttes som et endepunkt hos arter uden stærk splenisk udvælgelse i forhold til celler med mikrokerner, og når dyrene behandles kontinuerligt i en periode på over levetiden for erythrocytter i de arter, der anvendes (f.eks. fire uger eller mere hos mus).

Hvis der er grund til at tro, at testkemikaliet eller dets metabolit(ter) ikke vil nå frem til målvævet, er denne test ikke egnet.

Før brug af forsøgsmetoden til lovmæssig test af en blanding til generering af data bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.

PRINCIPPET FOR FORSØGSMETODEN

Dyrene eksponeres for testkemikaliet på passende vis. Hvis der benyttes knoglemarv, aflives dyrene humanitært på et passende tidspunkt efter behandlingen, hvorefter knoglemarven udtages, og der fremstilles præparater, som farves (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Hvis der benyttes perifert blod, tages der blodprøver på et passende tidspunkt efter behandlingen, hvorefter der fremstilles præparater, som farves (12) (16) (17) (18). Når behandlingen administreres akut, er det vigtigt at vælge tidspunkter for høst af knoglemarv eller blod, hvor der kan påvises behandlingsrelateret induktion af umodne erythrocytter med mikrokerner. I tilfælde af udtagning af perifert blod, skal der være gået tilstrækkelig lang tid til, at dette kan påvises i cirkulerende blod. Præparaterne analyseres for tilstedeværelse af mikrokerner, enten ved visualisering ved hjælp af et mikroskop, billedanalyse, flowcytometri eller laserscanning-cytometri.

KONTROL AF LABORATORIETS KOMPETENCE

Kompetenceundersøgelser

Med henblik på at fastslå, om der foreligger tilstrækkelige erfaringer med gennemførelse af assayet, før det tages i brug til rutinetest, bør laboratoriet have dokumenteret, at det er i stand til at reproducere forventede resultater ud fra offentliggjorte data (17) (19) (20) (21) (22) for frekvenser for mikrokerner med mindst to positive kontrolkemikalier (herunder svage responser induceret ved lave doser af positive kontroller), såsom dem, der er anført i tabel 1, og med kompatible bærestof-/opløsningsmiddelkontroller (jf. punkt 26). Til disse forsøg bør der anvendes doser, der giver reproducerbare og dosisrelaterede stigninger og påviser testsystemets følsomhed og dynamiske interval i det relevante væv (knoglemarv eller perifert blod) og ved hjælp af den scoringsmetode, som skal anvendes i laboratoriet. Dette krav gælder ikke for laboratorier, der har erfaring, dvs. som har en historisk database til rådighed som defineret i punkt 14-18.

Historiske kontroldata

I løbet af kompetenceundersøgelserne bør laboratoriet fastlægge:

- et historisk positivt kontrolområde og en historisk positiv kontrolfordeling og
- et historisk negativt kontrolområde og en historisk negativ kontrolfordeling.

Når der første gang indhentes data til en historisk negativ kontrolfordeling, bør de samtidige negative kontroller stemme overens med offentliggjorte kontrolldata, hvis sådanne findes. Efterhånden som der tilføjes flere forsøgsdata til den historiske kontrolfordeling, bør de samtidige negative kontroller ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af denne fordeling. Laboratoriets historiske negative kontroldatabase bør være så statistisk robust, at laboratoriet kan vurdere fordelingen af deres negative kontrolldata. Ifølge litteraturen kan det være nødvendigt at foretage mindst 10 forsøg, men det foretrækkes at foretage mindst 20 forsøg udført under sammenlignelige forsøgsbetingelser. Laboratorierne bør anvende kvalitetskontrolmetoder som f.eks. kontrolkort (f.eks. C-diagrammer eller X-søjlediagrammer (23)) til at identificere, hvor variable deres kontrolldata er, samt vise, at metodologien er "under kontrol" i deres laboratorium. Yderligere anbefalinger til, hvordan man opbygger og anvender de historiske data (dvs. kriterier for optagelse og udelukkelse af historiske data og acceptkriterier for et givent forsøg), kan findes i litteraturen (24).

Såfremt laboratoriet ikke gennemfører et tilstrækkeligt antal forsøg for at fastlægge en statistisk robust negativ kontrolfordeling (jf. punkt 15) under kompetenceundersøgelserne (beskrevet i punkt 13), kan det accepteres at opbygge fordelingen under de første rutinetest. Denne fremgangsmåde bør følge anbefalingerne i litteraturen (24), og de negative kontrolresultater, der opnås i disse forsøg, bør stemme overens med de offentliggjorte negative kontrolldata.

Der bør tages hensyn til eventuelle ændringer af forsøgsprotokollen med hensyn til, om de påvirker resultaterne på en måde, der stemmer overens med laboratoriets eksisterende historiske kontroldata. Kun store uoverensstemmelser bør føre til, at der etableres en ny historisk kontroldatabase, hvor eksperter vurderer, at den adskiller sig fra den tidligere fordeling (jf. punkt 15). Under genetableringen er der muligvis ikke behov for en fuldstændig negativ kontroldatabase for at give mulighed for at foretage en faktisk test, hvis laboratoriet kan påvise, at deres sideløbende negative kontrolværdier forbliver enten forenelige med deres tidligere database eller med de tilsvarende offentliggjorte data.

Negative kontrolldata bør bestå af forekomst af mikrokerner i umodne erythrocytter hos hvert dyr. Sideløbende negative kontroller bør ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af fordelingen af laboratoriets historiske negative kontroldatabase. Såfremt data fra sideløbende negative kontroller falder uden for kontrolgrænsen på 95 %, kan de eventuelt optages i den historiske kontrolfordeling, så længe disse data ikke er ekstreme afvigende værdier, og der er dokumentation for, at testsystemet er "under kontrol" (jf. punkt 15) og for, at der ikke er begået tekniske eller menneskelige fejl.

BESKRIVELSE AF METODEN

Forberedelser

Valg af dyreart

Der bør anvendes raske unge voksne dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Mus, rotter eller andre egnede pattedyrarter kan benyttes. Hvis der benyttes perifert blod, skal det fastslås, at splenisk fjernelse af celler med mikrokerner fra kredsløbet ikke gør det sværere at påvise inducerede mikrokerner hos udvalgte arter. Dette er klart blevet påvist for perifert blod hos mus og rotter (2). Den videnskabelige begrundelse for at bruge andre arter end rotter og mus bør anføres i rapporten. Hvis der anvendes andre arter end gnavere, anbefales det at integrere målingen af inducerede mikrokerner i en anden passende toksicitetstest.

Miljø og fodringsbetingelser

Temperaturen i dyrerummet bør for gnavere være 22 °C ($\pm$ 3 °C). Den relative luftfugtighed bør ideelt set være 50-60 %, dog mindst 40 % og helst ikke over 70 % bortset fra under rengøring af rummet. Belysningen bør være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke. For så vidt angår fodring, kan der anvendes konventionelt laboratorieføde med ubegrænset adgang til vand. Valget af føde kan påvirkes af behovet for at sikre en passende iblanding af et testkemikalie, når dette indgives ad denne vej. Gnavere bør opbevares i små grupper (højest fem dyr pr. bur) af samme køn og behandlingsgruppe, såfremt der ikke forventes aggressiv adfærd, fortrinsvist i solide gulvbure med passende miljøberigelse. Dyr bør kun opbevares individuelt, hvis dette er sagligt begrundet.

Klargøring af dyrene

Der anvendes normalt sunde unge voksne dyr (for gnavere ideelt set 6-10 uger gamle ved behandlingens start, selv om lidt ældre dyr også accepteres), som fordeles tilfældigt i kontrol- og behandlingsgrupperne. De enkelte dyr identificeres unikt ved hjælp af en human og minimalt invasiv metode (f.eks. med ring, mærke, mikrochip eller biometrisk identifikation, men ikke øre- eller tåklipning) og akklimatiseres til laboratoriebetingelserne i mindst fem dage. Burene indrettes på en sådan måde, at de mulige følger af burets placering minimeres. Krydskontaminering af den positive kontrol og testkemikallet bør undgås. Ved undersøgelsens start bør variationen i dyrenes vægt være minimal og ikke overstige $\pm$ 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn.

Fremstilling af doser

Faste testkemikalier opløses eller suspenderes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer eller iblandes føde eller drikkevand før indgivelse i dyrene. Flydende testkemikalier kan indgives direkte eller opløses før indgivelse. Til inhalationseksposering kan testkemikalier indgives som gas, damp eller en fast/flydende aerosol, afhængigt af deres fysisk-kemiske egenskaber. Der bør anvendes friske præparater af testkemikallet, medmindre stabilitetsdata påviser, at opbevaring er acceptabelt, og hensigtsmæssige opbevaringsbetingelser bør defineres.

Testbetingelser

Opløsningsmiddel/bærestof

Opløsningsmidlet/bærestoffet må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke kunne reagere kemisk med testkemikallet. Hvis der anvendes andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, bør deres anvendelse understøttes af referencedata om deres kompatibilitet. Det anbefales så vidt muligt først at overveje at anvende vandige opløsningsmidler/bærestoffer. Eksempler på almindeligt anvendte kompatible opløsningsmidler/bærestoffer omfatter vand, fysiologisk saltvand, methylcelluloseopløsning, saltopløsning af carboxymethylcellulosenatrium, olivenolie og majsolie. I fravær af historiske eller offentliggjorte kontroldata, der viser, at et valgt atypisk opløsningsmiddel/bærestof ikke frembringer mikrokerner og andre skadelige virkninger, bør der foretages en indledende undersøgelse for at fastlægge, om opløsningsmiddel-/bærestofkontrollen kan accepteres.

Kontroller

Positive kontroller

Hver test bør normalt omfatte en gruppe dyr, der behandles med et positivt kontrollkemikalie. Dette krav kan fraviges, hvis testlaboratoriet har påvist, at det er kompetent til at udføre testen og har fastlagt et historisk positivt kontrolområde. Såfremt der ikke indgår en sideløbende positiv kontrolgruppe, bør hvert enkelt forsøg omfatte scoringskontroller (fikserede og ufarvede prøver på objektglas eller celsuspensionsprøver, alt efter den anvendte scoringsmetode). Disse kan opnås ved i scoringen af undersøgelsen at inkludere passende referenceprøver, som er hentet og opbevaret fra et særskilt positivt og periodisk udført kontrolforsøg (f.eks. hver 6.-18. måned), f.eks. under kompetencetest og derefter regelmæssigt, hvor det er nødvendigt.

Positive kontrollkemikalier bør frembringe en påviselig forøgelse af frekvensen for mikrokerner over det spontane niveau. Ved anvendelse af manuel scoring ved mikroskopi bør der vælges sådanne doser i de positive kontrolprøver, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede prøvers identitet umiddelbart afsløres for den, der bedømmer dem. Det kan accepteres, at den positive kontrol administreres på anden vis end testkemikaliets ved hjælp af et andet behandlingsprogram, eller at prøveudtagningen kun forekommer på et bestemt tidspunkt. Hvis det er hensigtsmæssigt, bør der anvendes kemisk beslægtede positive kontrollkemikalier. Eksempler på positive kontrollkemikalier findes i tabel 1.

Tabel 1

Nedenfor er opstillet eksempler på positive kontrollkemikalier:

Kemikalier og CAS-registreringsnummer
Ethylmethansulfonat [CASRN 62-50-0]
Methylmethansulfonat [CASRN 66-27-3]
Ethylnitrosourinstof [CASRN 759-73-9]
Mitomycin C [CASRN 50-07-7]
Cyclophosphamidmonohydrat [CASRN 50-18-0 (CASRN 6055-19-2)]
Triethylenmelamin [CASRN 51-18-3]
Colchicin [CASRN 64-86-8] eller vinblastin [CASRN 865-21-4] — som aneugener

Negative kontroller

Dyr i den negative kontrolgruppe bør inkluderes på alle prøveudtagningstidspunkter og ellers håndteres på samme måde som behandlingsgrupperne, bortset fra at de ikke behandles med testkemikaliets. Hvis der anvendes et opløsningsmiddel/bærestof til administrering af testkemikaliets, bør kontrolgruppen modtage dette opløsningsmiddel/bærestof. Hvis der imidlertid konstant påvises forskelle mellem dyrene og hyppige forekomster af celler med mikrokerner i de historiske negative kontroldata på alle prøveudtagningstidspunkter for testlaboratoriet, er det muligvis kun nødvendigt med en enkelt prøveudtagning til den negative kontrol. Såfremt der bruges en enkelt prøveudtagning til negative kontroller, bør det være det første prøveudtagningstidspunkt, der anvendes i undersøgelsen.

Hvis der benyttes perifert blod, kan en forbehandlingsprøve accepteres i stedet for en sideløbende negativ kontrol for korttidsundersøgelser, når de opnåede resultater er i overensstemmelse med den historiske kontrol database for testlaboratoriet. For rotter er det påvist, at forbehandlingsprøver af mindre volumen (f.eks. under 100 µl/dag) har minimal indflydelse på baggrundsforekomsten af mikrokerner (25).

FREM GANGSMÅDE

Dyrenes antal og køn

Generelt er mikrokernerrespons ens mellem han- og hundyr, og de fleste undersøgelser kan derfor udføres hos begge køn (26). Data, der påviser relevante forskelle mellem han- og hundyr (f.eks. forskelle i systemisk toksicitet, metabolisme, biotilgængelighed, knoglemarvstoksicitet mv., herunder i en forprøve til bestemmelse af dosisinterval), vil tilskynde til, at begge køn anvendes. I så fald kan det være hensigtsmæssigt at foretage en undersøgelse hos begge køn, f.eks. som led i en toksicitetsundersøgelse med gentagen dosering. Det kan være hensigtsmæssigt at benytte faktormodellen, hvis begge køn anvendes. Oplysninger om, hvordan dataene analyseres med denne model, findes i tillæg 2.

Gruppernes størrelse ved undersøgelsens start bør fastlægges for at få mindst fem analyserbare dyr af samme køn eller af hvert køn, hvis begge anvendes, pr. gruppe. Hvis eksponeringen af mennesker for det kemiske stof er kønsspecifik, som det f.eks. er tilfældet med visse farmaceutiske stoffer, bør testen udføres med det pågældende køn. Vejledende vil en undersøgelse af knoglemarv, der udføres i henhold til de i punkt 37 fastlagte parametre med tre dosisgrupper og en sideløbende negativ og positiv kontrolgruppe (hvor hver gruppe består af fem dyr af samme køn) typisk højst kræve 25-35 dyr.

Dosisniveauer

Hvis der gennemføres en forprøve til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger egnede data, der kan bruges til at vælge dosis, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme, køn og behandlingsmåde, som agtes benyttet i hovedundersøgelsen (27). Formålet med undersøgelsen bør være at identificere den højst tolererede dosis (MTD) defineret som den højeste dosis, som tolereres uden dokumentation for undersøgelsesbegrænsende toksicitet i forhold til varigheden af undersøgelsesperioden (f.eks. ved at fremkalde et fald i kropsvægt eller cytotoxicitet i det hæmatopoietiske system), men ikke død eller tegn på smerte eller lidelse, der kræver human aflivning (28).

Højeste dosis kan også defineres som en dosis, der udviser tegn på toksicitet i knoglemarven (f.eks. en nedsættelse af andelen af umodne erythrocytter i forhold til totale erythrocytter i knoglemarv eller perifert blod på mere end 50 %, men ikke mindre end 20 % af kontrolværdien). Ved analyser af CD71-positive celler i det perifere blodkredsløb (dvs. ved flowcytometri) reagerer denne meget unge fraktion af umodne erythrocytter imidlertid hurtigere på toksiske udfordringer end den større RNA-positive kohorte af umodne erythrocytter. Derfor kan der være tegn på en højere tilsyneladende toksicitet med akut eksponeringsdesign ved undersøgelse af den CD71-positive umodne erythrocytfraktion i forhold til dem, der indikerer umodne erythrocytter baseret på RNA-indhold. Af denne grund kan den højeste dosis for testkemikalier, der forårsager toksicitet, når forsøg skal behandles i fem dage eller mindre, defineres som den dosis, der forårsager en statistisk signifikant reduktion i andelen af CD71-positive umodne erythrocytter i forhold til det samlede antal erythrocytter, men ikke mindre end 5 % af kontrolværdien (29).

Kemikalier, der udviser mætning af toksikokinetiske egenskaber eller fremkalder afgiftningsprocesser, som kan føre til et fald i eksponeringen efter en lang indgivelsesperiode, kan være undtagelser fra kriterierne om dosisfastsættelse og bør vurderes fra gang til gang.

For at opnå dosis/respons-oplysninger bør en fuldstændig undersøgelse omfatte en negativ kontrolgruppe og mindst tre dosisniveauer generelt adskilt af en faktor på 2, men ikke højere end 4. Hvis testkemikallet ikke fremkalder toksicitet i en forundersøgelse eller på grundlag af eksisterende data, bør den højeste dosis for en indgivelsesperiode på 14 dage eller derover være 1 000 mg/kg kropsvægt/dag eller for indgivelsesperioder på under 14 dage, 2 000 mg/kg kropsvægt/dag. Hvis testkemikallet imidlertid frembringer toksicitet, bør MTD være den højeste administrerede dosis, og de anvendte dosisniveauer bør fortrinsvist dække et interval fra maksimum til en dosis, der frembringer ringe eller ingen toksicitet. Når der observeres toksicitet i målvævet (knoglemarven) på alle de testede dosisniveauer, tilrådes det at foretage yderligere undersøgelser ved ikke-toksiske doser. Undersøgelser, der skal give en mere fuldstændig karakteristik af de kvantitative dosis/respons-oplysninger, kan kræve yderligere dosisgrupper. For visse typer testkemikalier (f.eks. humanlægemidler), som er omfattet af særlige krav, kan disse grænser variere.

Grænsetest

Hvis dosisforprøver eller eksisterende data fra beslægtede dyrestammer viser, at en behandling med som minimum grænsedosen (beskrevet nedenfor) ikke frembringer observerbare toksiske virkninger (herunder ingen formindskelse af knoglemarvsproliferation eller andre beviser på målvævet cytotoxicitet), og hvis der ikke forventes genotoksicitet baseret på in vitro-genotoksicitetsundersøgelser eller data fra strukturelt beslægtede kemikalier, er det ikke nødvendigt med en fuldstændig undersøgelse med tre dosisniveauer, forudsat at det er påvist, at testkemikallet når målvævet (knoglemarven). I så fald kan det være tilstrækkeligt med et enkelt-dosisniveau ved grænsedosis. For indgivelsesperioder på 14 dage eller derover er grænsedosis 1000 mg/kg kropsvægt/dag. For indgivelsesperioder på mindre end 14 dage er grænsedosis 2000 mg/kg kropsvægt/dag.

Indgivelse af doser

Den forventede indgivelsesmåde for mennesker bør overvejes i forbindelse med udformningen af et assay. Andre indgivelsesmåder såsom føde, drikkevand, topisk, subkutant, intravenøst, oralt (med sonde), inhalation, intratrachealt eller implantation kan vælges, hvis de kan begrundes. Under alle omstændigheder bør der vælges en indgivelsesmåde, der sikrer tilstrækkelig eksponering af målvævet. Intraperitoneal injektion anbefales generelt ikke, eftersom det ikke er en tilsigtet metode til human eksponering og kun bør anvendes med en specifik saglig begrundelse. Hvis testkemikallet iblandes føde eller drikkevand, navnlig med hensyn til enkeltdosering, bør det tilsikres, at tidsforskellen mellem indtagelse af føde og drikkevand og prøveudtagning er tilstrækkelig stor til, at virkningerne kan påvises (jf. punkt 37). Hvor stor en væskemængde der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Denne mængde må normalt højst være 1 ml/100 g kropsvægt, bortset fra vandige opløsninger, hvor der højst kan anvendes 2 ml/100 g kropsvægt. Anvendelse af større mængder bør begrundes. Bortset fra lokalirriterende eller ætsende testkemikalier, som normalt vil frembringe kraftigere virkninger ved højere koncentrationer, bør testmængden variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så indgivelsen sker ved samme mængde i forhold til kropsvægt ved alle dosisniveauer.

Behandlingsplan

Der udføres fortrinsvist to eller flere behandlinger indgivet med 24 timers mellemrum, navnlig ved at integrere denne test i andre toksicitetsundersøgelser. Alternativt kan der indgives enkeltbehandlinger, hvis det er videnskabeligt begrundet (f.eks. kemikalier, der er kendt for at blokere celleyklus). Testkemikalier kan også indgives som to deldoser, dvs. to eller flere behandlinger samme dag med kun 2-3 timers interval, hvorved det bliver lettere at indgive et større volumen. Under disse omstændigheder, eller når kemikallet indgives ved inhalation, bør prøveudtagningstidspunktet planlægges på grundlag af tidspunktet for den seneste indgivelse eller ved slutningen af eksponeringen.

Testen kan udføres på mus eller rotter på en af tre måder:

- a. Dyrene behandles med testkemikaliet en gang. Der udtages prøver af knoglemarv mindst to gange (fra uafhængige grupper af dyr), første gang tidligst 24 timer efter behandlingen, med passende intervaller mellem prøverne, sidste prøve dog senest 48 timer efter behandlingen, medmindre et testkemikalie er kendt for at have en usædvanlig lang halveringstid. Prøveudtagning tidligere end 24 timer efter behandlingen bør begrundes. Der udtages prøver af perifert blod mindst to gange (fra samme gruppe af dyr), tidligst 36 timer efter behandlingen og med et eller flere passende intervaller efter den første prøve, sidste prøve dog senest efter 72 timer. Ved første prøveudtagning bør alle dosisgrupper behandles, og der bør udtages prøver med henblik på analyse. Ved de(n) senere prøveudtagning(er) er det imidlertid kun den højeste dosis, som skal indgives. Når der påvises et positivt svar ved et prøveudtagningstidspunkt, er der ikke behov for yderligere prøver, medmindre der er brug for kvantitative dosis/respons-oplysninger. De beskrevne høsttidspunkter er en følge af mikrokernernes kinetik for tilstedeværelse og fravær i disse to vævsområder.
- b. Benyttes der to daglige behandlinger (f.eks. to behandlinger med to timers mellemrum) udtages der for knoglemarvs vedkommende prøver en gang mellem 18 og 24 timer efter den sidste behandling, eller for perifert blods vedkommende en gang mellem 36 og 48 timer efter den sidste behandling (30). De beskrevne høsttidspunkter er en følge af mikrokernernes kinetik for tilstedeværelse og fravær i disse to vævsområder.
- c. Benyttes der tre eller flere daglige behandlinger (f.eks. tre eller flere behandlinger med ca. 24 timers mellemrum), bør knoglemarvsprøver indsamles senest 24 timer efter den sidste behandling, og perifert blod bør indsamles senest 40 timer efter den sidste behandling (31). Denne behandlingsmulighed gør det muligt at kombinere kometassays (f.eks. prøveudtagning 2-6 timer efter den sidste behandling) med mikrokernetesten og integrere mikrokernetesten med undersøgelserne af toksicitet ved gentagen indgivelse. Akkumulerede data tydede på, at der kan observeres mikrokerneinduktion i disse bredere tidsrammer ved tre eller flere indgivelser (15).

Andre doserings- eller prøveudtagningsregimer kan anvendes, hvor det er relevant og videnskabeligt begrundet og for at fremme integrationen med andre toksicitetstest.

Observationer

Der bør foretages generelle kliniske observationer af forsøgsdyrene, og de kliniske tegn bør registreres mindst en gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er) hver dag og under hensyntagen til det tidspunkt, hvor de forventede virkninger efter dosering toppe. Alle dyr bør observeres mindst to gange dagligt i doseringsperioden for morbiditet og dødelighed. Alle dyr bør vejes ved undersøgelsens start, mindst en gang om ugen i undersøgelser med gentagne doser og ved aflivning. Ved undersøgelser af mindst en uges varighed bør foderindtag måles mindst en gang ugentligt. Hvis testkemikaliet indgives via drikkevandet, måles vandindtaget ved hvert vandskift og mindst en gang ugentligt. Dyr, der udviser ikkedødelig indikation for høj toksicitet, bør aflives humanitært før testperiodens udløb (28). Under visse omstændigheder kan dyrs kropstemperatur overvåges, da behandlingsinduceret hyper- og hypotermi har været medvirkende til at frembringe falske resultater (32) (33) (34).

Eksponering af målvæv

Der bør på passende tidspunkt(er) tages en blodprøve for at gøre det muligt at undersøge plasmaniveauer i testkemikaliet med henblik på at påvise, at der er sket eksponering af knoglemarven, hvor der er grundlag for dette, og hvor der ikke findes andre eksponeringsdata (jf. punkt 48).

Præparering af knoglemarv/blod

Knoglemarvceller udtages normalt fra dyrenes lårben eller skinneben umiddelbart efter human aflivning. Sædvanligvis udtages cellerne, hvorefter de præpareres og farves med velkendte metoder. Der kan udtages små mængder perifert blod i henhold til passende standarder for dyrevelfærd, enten ved hjælp af en metode, der lader forsøgsdyret overleve, som f.eks. ved blødning fra halevenen eller et andet egnet blodkar, eller ved hjertepunktur eller prøveudtagning fra et stort blodkar ved aflivning. For både knoglemarv eller erythrocytter fra perifert blod kan cellerne, afhængigt af analysemetoden, straks farves supravitalt (16) (17) (18), idet udstrygningspræparater fremstilles og derefter farves til mikroskopi eller fikseres og farves behørigt med henblik på flowcytometrianalyse. Ved at bruge en DNA-specifik farvning [f.eks. acridinorange (35) eller Hoechst 33258 plus pyronin-Y (36)] kan man undgå nogle af de artefakter, der optræder ved ikke-DNA-specifik farvning. Denne fordel udelukker ikke, at der benyttes konventionelle farvestoffer (f.eks. Giemsa ved mikroskopianalyse). Supplerende systemer [f.eks. cellulosekolonner til fjernelse af kerneindeholdende celler (37) (38)] kan også benyttes, forudsat at disse systemer påviseligt er kompatible med præpareringen af prøven i laboratoriet.

Hvis disse metoder kan anvendes, kan der anvendes anti-kinetokor-antistoffer (39), FISH med pancentromeriske DNA-prober (40) eller primet in situ-mærkning med pancentromerspecifikke primere og egnet DNA-kontrastfarvning (41) til at identificere arten af mikrokerner (kromosom/kromosomfragment) med henblik på at fastslå, om induktionen af mikrokerner skyldes klastogen og/eller aneugen aktivitet. Andre metoder til differentiering mellem klastogener og aneugener kan anvendes, hvis de har vist sig at være effektive.

Analyse (manuel og automatisk)

Alle objektglas eller prøver til analyse, herunder til positive og negative kontroller, bør kodes uafhængigt inden nogen form for analyse og bør randomiseres, så den manuelle bedømmer ikke har kendskab til behandlingsbetingelsen; denne bedømmelse er ikke nødvendig, når der anvendes automatiske scoringssystemer, som ikke bygger på visuel inspektion og ikke kan påvirkes af operatørbias. For hvert dyr bestemmes andelen af umodne erythrocytter i forhold til det samlede antal (umodne og modne) erythrocytter, idet der tælles mindst 500 erythrocytter i alt for knoglemarv og 2 000 erythrocytter for perifert blod (42). For hvert dyr scores mindst 4 000 umodne erythrocytter for forekomsten af umodne erythrocytter med mikrokerner (43). Hvis den historiske negative kontrol database viser, at den gennemsnitlige baggrundsfrekvens for umodne erythrocytter med mikrokerner er < 0,1 % i testlaboratoriet, bør det overvejes at score flere celler. Når prøverne analyseres, bør andelen af umodne erythrocytter i forhold til det samlede antal erythrocytter hos behandlede dyr ikke være mindre end 20 % af forholdet mellem bærestof-/opløsningsmiddelkontrol ved scoring ved mikroskopi og ikke mindre end ca. 5 % af forholdet mellem bærestof-/opløsningsmiddelkontrol ved scoring af CD71+ umodne erythrocytter CD71+ ved cytometrimetoder (jf. punkt 31) (29). For et knoglemarvsassay scoret ved mikroskopi gælder det f.eks., at hvis kontrolandelen af umodne erythrocytter i knoglemarven er 50 %, vil den øvre grænse for toksicitet være 10 % umodne erythrocytter.

Da rottemilten udskiller og destruerer erythrocytter med mikrokerner, foretrækkes det for at fastholde en høj følsomhed i assayet ved analyse af perifert blod at begrænse analysen af umodne erythrocytter med mikrokerner til den yngste fraktion. Ved hjælp af automatiserede analysemetoder kan disse mest umodne erythrocytter identificeres på basis af deres høje indhold af RNA eller det høje niveau af transferrinreceptorer (CD71+) udtrykt på deres overflade (31). En direkte sammenligning af forskellige farvningsmetoder har imidlertid vist, at der kan opnås et tilfredsstillende resultat med forskellige metoder, herunder traditionel acridinorange farvning (3) (4).

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

Individuelle dyredata fremlægges i tabelform. For hvert dyr registreres antallet af scorede umodne erythrocytter, antallet af umodne erythrocytter med mikrokerne og andelen af umodne erythrocytter i forhold til det samlede antal erythrocytter. Når mus behandles kontinuerligt i fire uger eller derover, bør der også anføres data om antallet og andelen af modne erythrocytter med mikrokerne, hvis de indsamles. Data om dyretoksicitet og kliniske tegn bør også anføres.

Acceptkriterier

Følgende kriterier bestemmer, om testen kan accepteres:

- a. De sideløbende negative kontroldata anses for at kunne føjes til laboratoriets historiske negative kontrolldatabase (jf. punkt 15-18)).
- b. Sideløbende positive kontroller eller scoringskontroller bør fremkalde responser, der er forenelige med responserne i den historiske positive kontrolldatabase, og medføre en statistisk set signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol (jf. punkt 24-25).
- c. Der er analyseret et passende antal doser og celler.
- d. Kriterierne for valg af højeste dosis er i overensstemmelse med kriterierne i punkt 30-33.

Evaluerings og fortolkning af resultater

Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis:

- a. Mindst en af behandlingsgrupperne viser en statistisk signifikant stigning i frekvensen af umodne erythrocytter med mikrokerne sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.
- b. Denne stigning er dosisafhængig på mindst et prøveudtagningstidspunkt, når den evalueres med en passende trend test.
- c. Et hvilken som helst af disse resultater ligger uden for fordelingen af de historiske negative kontrolldata (f.eks. Poisson-baserede kontrolgrænser på 95 %).

Hvis det kun er den højeste dosis, der undersøges på et bestemt prøveudtagningstidspunkt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis der er en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol, og resultaterne ligger uden for fordelingen af de historiske negative kontrolldata (f.eks. Poisson-baserede kontrolgrænser på 95 %). Anbefalinger til de mest hensigtsmæssige statistiske metoder kan findes i litteraturen (44) (45) (46) (47). Ved en dosis/respons-analyse bør mindst tre behandlede dosisgrupper analyseres. I de statistiske test bør dyret anvendes som forsøgsenhed. Positive resultater af mikrokernetesten viser, at testkemikaliets fremkalder mikrokerne, som er en følge af kromosombeskadigelse eller beskadigelse af mitoseapparatet hos erythroblaster i testarten. I det tilfælde, hvor der blev foretaget en test med henblik på at påvise centromerer i mikrokerne, er et testkemikalie, der producerer mikrokerne indeholdende centromer (DNA-centromer eller kinetokor, tegn på hele kromosomtab) tegn på, at testkemikaliets er et aneugen.

Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart negativt, hvis følgende er opfyldt under alle de undersøgte forsøgsbetingelser:

- a. Ingen af behandlingsgrupperne viser en statistisk signifikant stigning i frekvensen af umodne erythrocytter med mikrokerne sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.

- b. Der er ingen dosisrelateret stigning på noget prøveudtagningstidspunkt, når dette vurderes i en egnet trend test.
- c. Alle resultaterne ligger inden for fordelingen af de historiske negative kontroldata (f.eks. Poisson-baserede kontrolgrænser på 95 %).
- d. Knoglemarven blev eksponeret for testkemikaliet.

Anbefalinger til de mest hensigtsmæssige statistiske metoder kan findes i litteraturen (44) (45) (46) (47). Dokumentation for knoglemarvens eksponering for et testkemikalie kan omfatte et fald i forholdet mellem umodne og modne erythrocytter eller måling af plasma eller blodniveauer for testkemikaliet. I tilfælde af intravenøs indgivelse er der ikke behov for dokumentation for eksponering. Alternativt kan der anvendes ADME-data indsamlet i en uafhængig undersøgelse under anvendelse af den samme metode og de samme arter til påvise knoglemarvseksponering. Negative resultater viser, at testkemikaliet under testbetingelserne ikke fremkalder mikrokerner hos umodne erythrocytter hos testarterne.

Der er ikke krav om verifikation af en klart positiv eller negativ respons.

Hvis responsen hverken er klart negativ eller positiv og for at bidrage til at fastslå den biologiske relevans af et resultat (f.eks. en svag eller usikker stigning), bør dataene evalueres af eksperter, og/eller der bør foretages yderligere undersøgelser af de afsluttede forsøg. I nogle tilfælde kan det være nyttigt at analysere flere celler eller foretage en ny undersøgelse under anvendelse af modificerede forsøgsbetingelser.

I sjældne tilfælde, selv efter yderligere undersøgelser, giver dataene ikke mulighed for at konkludere, om testkemikaliet fremkalder enten positive eller negative resultater, og konklusionen er derfor, at undersøgelsen er tvetydig.

Testrapport

Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Resumé

Testkemikalie:

- oprindelse, batchnummer, frist for anvendelse, hvis dette foreligger
- testkemikaliets stabilitet, hvis kendt.

Stof med kun en bestanddel:

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

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

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

Præparering af testkemikaliet:

- begrundelse for valg af bærestof
- testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet/bærestoffet, hvis dette er kendt

- fastlæggelse af sammensætning af føde, drikkevand eller inhalationsformulering
- analytiske bestemmelser af formuleringer (f.eks. stabilitet, homogenitet og nominel koncentration), når disse foretages.

Forsøgsdyr:

- anvendt art/stamme og begrundelse herfor
- dyrenes antal, alder og køn
- kilde, miljøbetingelser, føde mv.
- metode til entydig identifikation af dyr
- for korttidsundersøgelser: de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse og slutning; for undersøgelser af mere end en uges varighed: individuel kropsvægt under undersøgelsen og fødeindtagelse. Kropsvægtinterval, gennemsnit og standardafvigelse for hver enkelt gruppe bør medtages.

Testbetingelser:

- positive og negative (bærestof/opløsningsmiddel) kontroldata
- data fra en eventuel forprøve til bestemmelse af dosisinterval
- begrundelse for valg af dosisniveau
- oplysninger om præparering af testkemikaliet
- oplysninger om indgivelse af testkemikaliet
- begrundelse for indgivelsesvej og -varighed
- metoder til kontrol af, at testkemikaliet eller testkemikalierne er nået frem til det almindelige kredsløb eller målvævet
- faktisk dosis (mg/kg kropsvægt/dag) beregnet på baggrund af testkemikaliets koncentration i foder/drikkevand (ppm) og forbrug, hvis relevant
- oplysninger om foder og vandkvalitet
- aflivningsmetode
- analgesimetode (hvis anvendt)
- detaljeret beskrivelse af behandling og prøveudtagningsplaner samt begrundelser for valg
- metoder til præparering af objektglas
- procedurer for isolering og bevaring af prøver
- metoder til måling af toksicitet
- kriterier for scoring af umodne erythrocytter med mikrokerner
- antal analyserede celler pr. dyr ved fastsættelse af frekvensen af umodne erythrocytter med mikrokerner og ved fastsættelse af forholdet mellem umodne og modne erythrocytter
- kriterier for accept af undersøgelsen
- metoder som f.eks. anvendelse af anti-kinetokor-antistoffer eller centromerspecifikke DNA-prober til bestemmelse af, om mikrokerner indeholder hele kromosomer eller kromosomfragmenter, hvor dette er relevant.

Resultater:

- dyrenes tilstand før og i løbet af testperioden, herunder tegn på toksicitet
- andel af umodne erythrocytter i forhold til samlet antal erythrocytter
- antal umodne erythrocytter med mikrokerner, anført særskilt for hvert dyr
- gennemsnit $\pm$ standardafvigelse for umodne erythrocytter med mikrokerner for hver gruppe
- dosis/respons-forhold, hvor muligt
- statistiske analyser og anvendte metoder
- sideløbende negative og positive kontroldata med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser
- historisk negative og positive kontroldata med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser og kontrolgrænser på 95 % for fordelingen samt tidsperiode og antal datapunkter
- data for, at eksponering af knoglemarven fandt sted
- karakteriseringsdata, der viser, om mikrokerner indeholder hele kromosomer eller kromosomfragmenter, hvor dette er relevant
- opfyldte kriterier for en positiv eller negativ respons.

*Diskussion af resultater.**Konklusion.**Referencer.*

LITTERATUR

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Hayashi, M. *et al.* (2007), *in vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 627/1, pp. 10-30.
- (3) MacGregor, J.T. *et al.* (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, Toxicology Sciences, Vol. 94/1, pp. 92-107.
- (4) Dertinger, S.D. *et al.* (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, Toxicological Sciences, Vol. 94/1, pp. 83-91.
- (5) Dertinger, S.D. *et al.* (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage, Mutagenesis, Vol. 26/1, pp. 139-145.
- (6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, Mutation Research, Vol. 370/1, pp. 65-73.
- (7) Asano, N. *et al.* (1998), An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravital stained peripheral blood cells, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 404/1-2, pp. 149-154.

-
- (8) Styles, J.A. *et al.* (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, *Cytometry*, Vol. 44/2, pp. 153-155.
- (9) Heddle, J.A. (1973), A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 187-190.
- (10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 31/1, pp. 9-15.
- (11) Heddle, J.A. *et al.* (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 123/1, pp. 61-118.
- (12) Mavournin, K.H. *et al.* (1990), The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 239/1, pp. 29-80.
- (13) MacGregor, J.T. *et al.* (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, *Developments in Toxicology Environmental Science*, Vol. 11, pp. 555-558.
- (14) MacGregor, J.T. *et al.* (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 189/2, pp. 103-112.
- (15) MacGregor, J.T. *et al.* (1990), The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, *Fundamental and Applied Toxicology*, Vol. 14/3, pp. 513-522.
- (16) Hayashi, M. *et al.* (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 245/4, pp. 245-249.
- (17) CSGMT/JEMS.MMS — The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 278/2-3, pp. 83-98.
- (18) CSGMT/JEMS.MMS — The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), *Mutagenesis*, Vol. 10/3, pp. 153-159.
- (19) Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 23/4, pp. 239-273.
- (20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 453/1, pp. 45-50.
- (21) Hayes, J. *et al.* (2009), The rat bone marrow micronucleus test—study design and statistical power, *Mutagenesis*, Vol. 24/5, pp. 419-424.
- (22) Wakata, A. *et al.* (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 32/1, pp. 84-100.
- (23) Ryan, T.P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

- (24) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87-90.
- (25) Rothfuss, A. *et al.* (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 108-120.
- (26) Hayashi, M. *et al.* (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.
- (27) Fielder, R.J. *et al.* (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.
- (28) OECD (2000), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.
- (29) LeBaron, M.J. *et al.* (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 54/3, pp. 222-228.
- (30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, Vol. 10/4, pp. 313-319.
- (31) Hayashi, M. *et al.* (2000), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 35/3, pp. 234-252.
- (32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 390/1-2, pp. 79-83.
- (33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 413/1, pp. 7-14.
- (34) Spencer, P.J. *et al.* (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, Toxicological Sciences, Vol. 97/1, pp. 120-127.
- (35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutation Research Letters, Vol. 120/4, pp. 241-247.
- (36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, Mutation Research, Vol. 120/4, pp. 269-275.
- (37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 213/1, pp. 91-104.
- (38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, Mutation Research, Vol. 439/1, pp. 121-126.
- (39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*, Mutagenesis, Vol. 5/4, pp. 411-415.
- (40) Miller, B.M. *et al.* (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, Vol. 6/4, pp. 297-302.

-
- (41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, *American Journal of Medical Genetics*, Vol. 107/2, pp. 99-104.
- (42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 347/2, pp. 97-99.
- (43) OECD (2014), "Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.
- (44) Richold, M. *et al.* (1990), "In Vivo Cytogenetics Assays", in *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised*, Kirkland, D. J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.
- (45) Lovell, D.P. *et al.* (1989), "Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays", in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.
- (46) Hayashi, M. *et al.* (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 102/Suppl 1, pp. 49-52.
- (47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 469/2, pp. 233-241.
-

Tillæg 1

DEFINITIONER

Centromer: Region(er) af et kromosom, hvortil tetrådene er påhæftet under celledeling, således at datterkromosomerne kan ordnes i forhold til dattercellernes poler.

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

Erythroblast: Et tidligt stadium af erythrocyt udvikling umiddelbart forud for den umodne erythrocyt, hvor cellen stadig indeholder en kerne.

Kinetokor: Proteinstruktur, der dannes på centromeren af eukaryote celler, der forbinder kromosomet til mikrotubule polymerer fra mitotisk spindel under mitose og meiose og fungerer under celledeling til at trække søsterkromatider fra hinanden.

Mikrokerner: Små ekstrakerner, der er adskilt fra cellens hovedkerne, og som dannes under mitosens telofase (meiose) ud fra efterladte kromosomfragmenter eller hele kromosomer.

Normokromatisk eller moden erythrocyt: En fuldmoden erythrocyt, der har mistet den resterende RNA, der er tilbage efter enukleation, og/eller har mistet andre kortvarige cellemarkører, der typisk forsvinder efter enukleation efter den endelige erythroblastdeling.

Polykromatisk eller umoden erythrocyt: En nydannet erythrocyt på et udviklingsmellemstadium, som farves med både blå og røde elementer af klassiske blodfarver såsom Wrights Giemsa på grund af tilstedeværelsen af resterende RNA i den nydannede celle. Disse nydannede celler er omtrent de samme som retikulocyter, som vises ved hjælp af en vital farvning, der får den resterende RNA til at klumpe sammen i et retikulum. Andre metoder, herunder monokromatisk farvning af RNA med fluorescerende farvestoffer eller mærkning af kortvarige overflademarkører såsom CD71 med fluorescerende antistoffer, anvendes nu ofte til at identificere den nyoprettede røde blodcelle. Polykromatiske erythrocyter, retikulocyter og CD71-positive erythrocyter er alle umodne erythrocyter, men har en noget forskellig aldersfordeling.

Retikulocyt: En nydannet erythrocyt farvet med en vital farvning, der får resterende cellulært RNA til at klumpe sig sammen i et karakteristisk retikulum. Retikulocyter og polykromatiske erythrocyter har nogenlunde samme cellulære aldersfordeling.

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

Tillæg 2

FAKTORMODEL TIL IDENTIFIKATION AF KØNSBETINGEDE FORSKELLE I IN VIVO-MIKROKERNEASSAYET**Faktormodellen og dens analyse**

I denne model testes mindst fem hanner og fem hunner på hvert koncentrationsniveau, hvilket betyder, at der med denne model anvendes mindst 40 dyr (20 hanner og 20 hunner plus relevante positive kontroller).

Modellen, som er en af de enklere faktormodeller, svarer til en tovejsanalyse af varians med køn og koncentration som de primære virkninger. Dataene kan analyseres ved hjælp af mange statistiske standardsoftwarepakker som SPSS, SAS, STATA, Genstat, samt under anvendelse af R.

Analysen opdeler variationen i datasættet i variationen mellem kønnene, mellem koncentrationerne og i relation til interaktionen mellem kønnene og koncentrationerne. Hvert forhold testes mod et estimat af variationen mellem replikate dyr inden for grupper af dyr af samme køn ved samme koncentration. Fuldstændige oplysninger om den underliggende metode fås i mange statistiske standardlærebøger (jf. referencer) og i hjælpefunktionerne i de statistiske pakker.

Analysen fortsætter med at undersøge interaktionen mellem køn og koncentration i ANOVA-tabellen ⁽¹⁾. Uden en væsentlig interaktion giver de kombinerede værdier på tværs af køn eller koncentrationsniveauer gyldige statistiske test mellem niveauerne baseret på den samlede gruppevariation i ANOVA-tabellen.

Analysen fortsætter med at opdele skønnet af variationen mellem koncentrationer i kontraster, som giver en test for lineære og kvadratiske kontraster mellem respons på tværs af koncentrationsniveauerne. Hvis der er en betydelig interaktion mellem køn og koncentration, kan denne interaktion også indeles i lineære kontraster x køn og kvadratiske kontraster x køn. Dette giver test af, om koncentrationsresponsen er parallelle for de to køn, eller om der er en differentieret respons mellem dem.

Skønnet over den samlede variation i gruppen kan bruges til parvise test af forskellen mellem medianer. Disse sammenligninger kan foretages mellem medianerne for de to køn og mellem medianerne for de forskellige koncentrationsniveauer såsom for sammenligninger med de negative kontrolniveauer. I de tilfælde hvor der er en væsentlig interaktion, kan der foretages sammenligninger mellem medianerne for de forskellige koncentrationer inden for samme køn eller medianerne for de to køn ved samme koncentration.

Referencer

Der findes mange statistiske lærebøger, som diskuterer teori, model, metode, analyse og fortolkning af faktormodeller, lige fra enkle to-faktor-analyser til de mere komplekse modeller, som anvendes ved »Design of Experiment«-metoder. Her følger en ikke-udtømmende liste. Nogle bøger indeholder bearbejdede eksempler på sammenlignelige modeller, i nogle tilfælde med en kode til at køre analyserne ved hjælp af forskellige softwarepakker.

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

⁽¹⁾ Statistikere, der anvender en modelleringsmetode såsom f.eks. lineære normale modeller (General Linear Models, GLM) kan have en anden, men sammenlignelig tilgang til analysen, men når ikke nødvendigvis frem til den traditionelle ANOVA-tabel, der er baseret på algoritmiske metoder til beregning af statistik udviklet før computerens indtog.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1997). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.«

- 6) Del B, kapitel B.15 udgår.
- 7) Del B, kapitel B.16 udgår.
- 8) Del B, kapitel B.18 udgår.
- 9) Del B, kapitel B.19 udgår.
- 10) Del B, kapitel B.20 udgår.
- 11) Del B, kapitel B.24 udgår.
- 12) Del B, kapitel B.47, affattes således:

»B.47 Forsøgsmetode til påvisning af oksecornea-uklarhed og -permeabilitet til identifikation af i) kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade, og ii) kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline (TG)) 437 (2013). Forsøgsmetoden til påvisning af oksecornea-uklarhed og -permeabilitet (BCOP-forsøgsmetoden) blev evalueret af Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) sammen med Det Europæiske Center for Validering af Alternative Metoder (ECVAM) og Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) i 2006 og 2010 (1) (2). I den første evaluering blev BCOP-forsøgsmetoden evalueret med henblik på at identificere kemikalier (stoffer og blandinger), der medfører alvorlig øjenskade (1). I den anden evaluering blev BCOP-forsøgsmetoden evalueret med henblik på at identificere kemikalier (stoffer og blandinger), der ikke er klassificeret som forårsagende øjenirritation eller alvorlig øjenskade (2). BCOP-valideringsdatabasen indeholdt i alt 113 stoffer og 100 blandinger (2) (3). Ud fra disse evalueringer og deres peer reviews blev det konkluderet, at forsøgsmetoden på korrekt vis såvel kan anvendes til at identificere kemikalier (både stoffer og blandinger), der medfører alvorlig øjenskade (kategori 1), som dem, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade som defineret ved De Forenede Nationers (FN) globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (GHS) (4) og forordning (EF) nr. 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP) ⁽¹⁾, og den blev derfor anerkendt som videnskabeligt gyldig til begge formål. Alvorlig øjenskade er frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsettelse, som opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter påføring. Testkemikalier, der medfører alvorlig øjenskade, er klassificeret som UN GHS-kategori 1. Kemikalier, der ikke klassificeres som forårsagende øjenirritation eller alvorlig øjenskade, defineres på samme måde som de kemikalier, der ikke opfylder kravene med hensyn til klassificering som UN GHS-kategori 1 eller 2 (2A eller 2B), dvs. de betegnes som UN GHS uden for kategori. Forsøgsmetoden omfatter den anbefalede anvendelse og begrænsninger af BCOP-forsøgsmetoden baseret på dens evalueringer. De vigtigste forskelle mellem den oprindelige udgave fra 2009 og den opdaterede udgave fra 2013 af OECD's vejledning (Test Guideline) omfatter, men er ikke begrænset til: anvendelse af BCOP-forsøgsmetoden til at identificere kemikalier, der ikke kræver UN GHS-klassificering (punkt 2 og 7), præcisering af anvendelsen af BCOP-forsøgsmetoden til test af alkoholer, ketoner og faste stoffer (punkt 6 og 7) og af stoffer og blandinger (punkt 8), præcisering af, hvordan overfladeaktive stoffer og blandinger, som indeholder overfladeaktive stoffer, testes (punkt 28), ajourføringer og præciseringer af de positive kontroller (punkt 39 og 40), en opdatering af beslutningskriterierne for BCOP-forsøgsmetoden (punkt 47), ajourføring af undersøgelsesacceptkriterier (punkt 48), ajourføring af testrapportens elementer (punkt 49), ajourføring af tillæg 1 om definitioner, tilføjelse af tillæg 2 om BCOP-forsøgsmetodens forudsigelsesevne efter forskellige klassifikations-systemer, ajourføring af tillæg 3 på listen over kompetencekemikalier og ajourføring af tillæg 4 om BCOP-corneaholderen (punkt 1) og opacitometeret (punkt 2 og 3).

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

I dag er det generelt accepteret, at der i den nærmeste fremtid ikke vil være en enkelt *in vitro*-øjenirritationstest, der vil kunne erstatte *in vivo*-Draize-øjentesten til forudsigelse af hele spektret af irritation for forskellige kemikaliegrupper. Imidlertid vil strategiske kombinationer af flere alternative forsøgsmetoder i en (trinvis) teststrategi muligvis kunne erstatte Draize-øjentesten (5). Top-down-tilgangen (5) er beregnet til at skulle anvendes, hvor et kemikalie på grund af eksisterende oplysninger ventes at have et højt irritationspotentiale, mens bottom-up-tilgangen (5) er beregnet til at skulle anvendes, hvor et kemikalie på grund af eksisterende oplysninger ikke ventes at forårsage tilstrækkelig øjenirritation til, at der kræves en klassificering. BCOP-forsøgsmetoden er en *in vitro*-forsøgsmetode, som kan anvendes under visse omstændigheder og med særlige begrænsninger for klassificering af risikoen for øjenskader og mærkning af kemikalier. Selv om den ikke betragtes som en gyldig enkeltstående erstatning for *in vivo*-kaninøjentesten, anbefales BCOP-forsøgsmetoden som første trin i en teststrategi, såsom top-down-tilgangen som anført af Scott *et al.* (5), til at identificere kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade, dvs. kemikalier, der skal klassificeres som UN GHS-kategori 1 uden yderligere test (4). BCOP-forsøgsmetoden anbefales også til at identificere kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade, som defineret i UN GHS (UN GHS uden for kategori) (4) i en teststrategi, såsom bottom-up-tilgangen (5). Et kemikalie, som ikke forudses at forårsage alvorlig øjenskade, eller som ikke er klassificeret som forårsagende irritation/alvorlig øjenskade med BCOP-forsøgsmetoden, vil kræve yderligere test (*in vitro* og/eller *in vivo*), for at den endelige klassificering kan fastslås.

Formålet med denne forsøgsmetode er at beskrive de procedurer, som anvendes til at vurdere et testkemikalies potentielle risiko for øjenskade som målt ved dets evne til at inducere uklarhed og øget permeabilitet i en isoleret oksecornea. Toksiske virkninger for cornea måles ved: i) nedsat lystransmission (uklarhed) og ii) øget passage af farvestoffet natriumfluorescein (permeabilitet). Uklarheds- og permeabilitetsvurderingerne af cornea efter eksponering for et testkemikalie kombineres til udledning af en *in vitro*-irritationsscore (IVIS, In Vitro Irritancy Score), som anvendes til at klassificere testkemikaliet irritationsniveau.

Definitioner findes i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

Denne forsøgsmetode er baseret på ICCVAM BCOP-forsøgsmetodeprotokollen (6) (7), som oprindeligt blev udviklet på baggrund af oplysninger fra protokollen fra Institute for *in vitro* Sciences (IIVS) og INVITTOX Protocol 124 (8). Sidstnævnte er den protokol, der blev anvendt til De Europæiske Fællesskabers sponsorerede prævalideringsundersøgelse, som blev gennemført i 1997-1998. Begge disse protokoller var baseret på BCOP-forsøgsmetoden, som først blev rapporteret af Gautheron *et al.* (9).

BCOP-forsøgsmetoden kan anvendes til at identificere kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade som defineret af UN GHS, dvs. kemikalier, der skal klassificeres som UN GHS-kategori 1 (4). BCOP-forsøgsmetoden har til dette formål en generel nøjagtighed på 79 % (150/191), en falsk positiv-rate på 25 % (32/126) og en falsk negativ-rate på 14 % (9/65) sammenlignet med *in vivo*-kaninøjeforsøgsmetodedata klassificeret i henhold til UN GHS-klassificeringssystemet (3) (jf. tillæg 2, tabel 1). Når testkemikalier inden for visse kemiske (dvs. alkoholer, ketoner) eller

fysiske (dvs. faste stoffer) klasser udelukkes fra databasen, har BCOP-forsøgsmetoden en nøjagtighed på 85 % (111/131), en falsk positiv-rate på 20 % (16/81) og en falsk negativ-rate på 8 % (4/50) for UN GHS-klassificeringssystemet (3). De mulige mangler ved BCOP-forsøgsmetoden, når den anvendes til at identificere kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade (UN GHS-kategori 1) er baseret på de høje falsk positiv-rater for alkoholer og ketoner og den høje falsk negativ-rate for faste stoffer i valideringsdatabasen (1) (2) (3). Da ikke alle alkoholer og ketoner imidlertid overfortolkes af BCOP-forsøgsmetoden, og nogle fortolkes korrekt som UN GHS-kategori 1, anses disse to organiske funktionelle grupper ikke for at ligge uden for forsøgsmetodens anvendelsesområde. Det er op til brugeren af denne forsøgsmetode at beslutte, om en mulig overfortolkning af en alkohol eller keton kan accepteres, eller om der bør foretages yderligere "weight-of-evidence"-undersøgelser. Med hensyn til falsk negativ-raterne for faste stoffer skal det bemærkes, at faste stoffer kan føre til varierende og ekstrem eksponering i *in vivo*-Draize-øjenirritationstesten, hvilket kan medføre irrelevante forudsigelser af deres sande irritationspotentiale (10). Det skal også bemærkes, at ingen af de falsk negative resultater i ICCVAM-valideringsdatabasen (2) (3) ved identifikation af kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade (UN GHS-kategori 1), resulterede i $IVIS \leq 3$, som er det kriterium, der anvendes til at identificere et testkemikalie som UN GHS uden for kategori. Endvidere er falsk negative resultater af BCOP-forsøgsmetoden i denne forbindelse ikke afgørende, eftersom alle testkemikalier, der giver en $3 < INIS \leq 55$, efterfølgende vil blive testet med andre tilstrækkeligt validerede *in vitro*-test, alt efter de forskriftsmæssige krav, ved anvendelse af en sekventiel teststrategi med en "weight-of-the-evidence"-tilgang. Da visse faste kemikalier fortolkes korrekt af BCOP-forsøgsmetoden som UN GHS-kategori 1, anses denne fysiske tilstand heller ikke for at ligge uden for forsøgsmetodens anvendelsesområde. Undersøgeren kan overveje at anvende denne forsøgsmetode til alle typer kemikalier, hvorved en $IVIS > 55$ bør accepteres som indikation på alvorlig øjenskade, der bør klassificeres som UN GHS-kategori 1 uden yderligere test. Som allerede nævnt bør positive resultater for alkoholer eller ketoner dog fortolkes med forsigtighed som følge af risikoen for overfortolkning.

BCOP-forsøgsmetoden kan også anvendes til at identificere kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade i henhold til UN GHS-klassificeringssystemet (4). BCOP-forsøgsmetoden har til dette formål en generel nøjagtighed på 69 % (135/196), en falsk positiv-rate på 69 % (61/89) og en falsk negativ-rate på 0 % (0/107) i sammenligning med *in vivo*-kaninøjeforsøgsmetodedata klassificeret i henhold til UN GHS-klassificeringssystemet (3) (jf. tillæg 2, tabel 2). Den falsk negativ-rate, der opnås (*in vivo*-kemikalier klassificeret som UN GHS uden for kategori, der frembringer en $IVIS > 3$, jf. punkt 47) anses for at være høj, men ikke afgørende, eftersom alle testkemikalier, der giver en $3 < INIS \leq 47$, efterfølgende vil blive testet med andre tilstrækkeligt validerede *in vitro*-test, alt efter de forskriftsmæssige krav, ved anvendelse af en sekventiel teststrategi med en "weight-of-the-evidence"-tilgang. BCOP-forsøgsmetoden viser ingen specifikke mangler vedrørende test af alkoholer, ketoner og faste stoffer, når formålet er at identificere kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade (UN GHS uden for kategori) (3). Undersøgerne kunne overveje at anvende denne forsøgsmetode til alle typer kemikalier, hvorved et negativt resultat ($IVIS < 3$) bør accepteres som tegn på, at ingen klassifikation er påkrævet (UN GHS uden for kategori). Da BCOP-forsøgsmetoden kun kan identificere 31 % af de kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade, korrekt, må metoden ikke være det første valg til at indlede en bottom-up-tilgang (5), hvis der findes andre validerede og anerkendte *in vitro*-metoder med tilsvarende høj følsomhed, men højere specificitet.

BCOP-valideringsdatabasen indeholdt i alt 113 stoffer og 100 blandinger (2) (3). BCOP-forsøgsmetoden anses derfor for at være gælde test af både stoffer og blandinger.

BCOP-forsøgsmetoden anbefales ikke til identifikation af testkemikalier, der bør klassificeres som øjenirriterende (UN GHS-kategori 2 eller -kategori 2A) eller testkemikalier, der bør klassificeres som let øjenirriterende (UN GHS-kategori 2B) som følge af det store antal kemikalier i UN GHS-kategori 1, der underklassificeres som UN GHS-kategori 2, 2A eller 2B, og kemikalier, der ifølge UN GHS er uden for kategori, og som overklassificeres som UN GHS-kategori 2, 2A eller 2B (2) (3). Til dette formål kan der være behov for at gennemføre yderligere test med en anden egnet metode.

Alle procedurer med okseøjne og oksecorneae bør følge testfacilitetens gældende forskrifter og procedurer for håndtering af animalske materialer, hvilket omfatter, men ikke er begrænset til, væv og vævsvæsker. Det anbefales at benytte universale laboratorieforsigtighedsregler (11).

Mens BCOP-forsøgsmetoden ikke tager højde for conjunctiva- og irisskader, behandler den corneavirkninger, som er de vigtigste faktorer for klassificering in vivo med hensyn til UN GHS-klassificering. Reversibiliteten af cornealæsioner kan ikke vurderes i sig selv med BCOP-forsøgsmetoden. Det er på grundlag af kaninøjeundersøgelser foreslået, at en vurdering af den indledende cornealæsionsdybde kan anvendes til at identificere visse typer irreversible virkninger (12). Der er dog behov for yderligere videnskabelig viden for at forstå, hvordan irreversible virkninger, der ikke er forbundet med indledende stor skade, opstår. Endelig muliggør BCOP-forsøgsmetoden ikke vurdering af den potentielle systemiske toksicitet i forbindelse med øjeneksponering.

Denne forsøgsmetode vil blive opdateret regelmæssigt, i takt med at nye oplysninger og data behandles. Histopatologi kan f.eks. være potentielt nyttig ved behov for en mere fuldstændig beskrivelse af skader på cornea. Som beskrevet i OECD's vejledning nr. 160 (13) opfordres brugerne til at konservere corneae og udarbejde histopatologiprøver, der kan bruges til at udvikle en database og beslutningskriterier, der kan forbedre nøjagtigheden af denne forsøgsmetode yderligere.

Ethvert laboratorium bør, når det påbegynder brug af denne forsøgsmetode, benytte kompetencekemikalierne i tillæg 3. Et laboratorium kan benytte disse kemikalier til at godtgøre sin tekniske kompetence vedrørende brug af BCOP-forsøgsmetoden, inden det påbegynder fremsendelse af BCOP-forsøgsmetodedata med henblik på forskriftsmæssig fareklassificering.

PRINCIP FOR TESTEN

BCOP-forsøgsmetoden er en organotypisk model, som kortvarigt opretholder normal fysiologisk og biokemisk funktion af oksecornea in vitro. Ved denne forsøgsmetode vurderes testkemikaliet's beskadigende virkning ved kvantitative målinger af ændringer i cornea-uklarhed og -permeabilitet med henholdsvis et opacitometer og et spektrofotometer til synligt lys. Begge målinger anvendes til at beregne en IVIS, som anvendes til at tildele en in vitro-irritationsfareklassificeringskategori med henblik på forudsigelse af et testkemikalies in vivo-øjenirritationspotentiale (jf. Beslutningskriterier i punkt 48).

I BCOP-forsøgsmetoden anvendes isolerede corneae fra øjnene fra friskslagtet kvæg. Cornea-uklarhed måles kvantitativt som mængden af lystransmission gennem cornea. Permeabilitet måles kvantitativt som mængden af farvestoffet natriumfluorescein, der passerer gennem den fulde tykkelse af cornea som påvist i mediet i det bageste kammer. Testkemikalierne tilføres til cornea-epitelooverfladen ved tilsætning til corneaholderens forreste kammer. I tillæg 4 findes en beskrivelse af og et diagram over en corneaholder, som anvendes i BCOP-forsøgsmetoden. Corneaholdere kan købes i handelen fra forskellige kilder eller konstrueres.

Kilde til okseøjne og deres alder samt udvælgelse af dyrearter

Kvæg, som sendes til slagterier, aflives typisk enten med henblik på anvendelse til konsum eller anden kommerciel udnyttelse. Kun raske dyr, som anses for egnede til at indgå i menneskets fødekæde, anvendes som kilde til corneae til brug i BCOP-forsøgsmetoden. Eftersom vægtintervallet for kvæg er bredt og afhænger af race, alder og køn, er der ingen anbefalet vægt for dyrene på slagtetidspunktet.

Der kan forekomme variationer i corneadimensioner ved anvendelse af øjne fra dyr med forskellig alder. Corneae med en vandret diameter $> 30,5$ mm og værdier for den centrale corneatykkelse (CCT) på $\geq 1\ 100$ μm stammer i almindelighed fra kvæg, som er mere end otte år gamle, mens corneae med en vandret diameter $< 28,5$ mm og CCT < 900 μm i almindelighed stammer fra kvæg, som er mindre end fem år gamle (14). Derfor anvendes der typisk ikke øjne fra kvæg, som er mere end 60 måneder gamle. Øjne fra kvæg, som er mindre end 12 måneder gamle, har traditionelt ikke været anvendt, eftersom disse øjne stadig er i udviklingsfasen, og corneatykkelsen og -diameteren er betydeligt mindre end det rapporterede for øjne fra voksent kvæg. Anvendelse af corneae fra yngre (dvs. 6-12 måneder gamle) dyr er imidlertid tilladelig, eftersom det giver visse fordele, såsom øget tilgængelighed, et snævert aldersinterval og nedsat risiko for potentiel arbejdstagereksposering for bovin spongiform encefalopati (BSE) (15). Da yderligere vurdering af betydningen af corneastørrelse eller -tykkelse for responsen på ætsende og irriterende kemikalier ville være nyttig, opfordres brugerne til at rapportere den estimerede alder og/eller vægt for de dyr, hvorfra de corneae, der undersøges, stammer.

Indsamling og transport af øjne til laboratoriet

Øjnene indsamles af slagteriarbejdere. For at minimere mekanisk og anden beskadigelse af øjnene bør de enukleeres hurtigst muligt efter dyrenes aflivning og nedkøles straks efter enukleering og under transport. For at forhindre at øjnene eksponeres for potentielt irriterende kemikalier, må slagteriarbejderne ikke anvende rensmiddel, når de skyller dyrenes hoveder.

Øjnene bør nedsænkes helt i nedkølet Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) i en beholder af en passende størrelse og transporteres til laboratoriet på en sådan måde, at ødelæggelse og/eller bakteriekontaminering minimeres. Eftersom øjnene indsamles under slagteprocessen, vil de kunne blive eksponeret for blod og andre biologiske materialer, herunder bakterier og andre mikroorganismer. Det er derfor vigtigt at sikre, at risikoen for kontaminering minimeres (f.eks. ved at opbevare beholderen med øjnene på våd is under indsamling og transport, ved at tilsætte antibiotika til den HBSS, som øjnene opbevares i under transport [f.eks. penicillin i en koncentration på 100 IE/ml og streptomycin i en koncentration på 100 $\mu\text{g/ml}$]).

Tidsintervallet mellem indsamling af øjnene og anvendelsen af corneae i BCOP-forsøgsmetoden bør minimeres (typisk indsamling og anvendelse samme dag), og det bør påvises, at intervallets varighed ikke påvirker assayresultaterne negativt. Disse resultater er baseret på udvælgelseskriterierne for øjnene såvel som de positive og negative kontrolresponsen. Alle de øjne, som anvendes i assayet, bør stamme fra samme gruppe øjne, som er indsamlet på en bestemt dag.

Udvælgelseskriterier for øjne, der anvendes i BCOP-forsøgsmetoden

Når øjnene er ankommet til laboratoriet, undersøges de omhyggeligt for defekter, herunder øget uklarhed, ridser og neovaskularisering. Der anvendes kun corneae fra øjne, som er fri for sådanne defekter.

Kvaliteten af hver enkelt cornea vurderes også på senere assaytrin. Corneae med en uklarhed på mere end syv uklarhedsenheder eller tilsvarende for det opacitometer og de corneaholdere, der anvendes efter en indledende ligevægtsindstillingsperiode på en time, skal kasseres (BEMÆRK: opacitometeret bør kalibreres med uklarhedsstandards, som anvendes til at fastlægge uklarhedsenhederne, se tillæg 4).

Hver behandlingsgruppe (testkemikalie, samtidige negative og positive kontroller) består af minimum tre øjne. Der bør anvendes tre corneae som negative kontrolcorneae i BCOP-forsøgsmetoden. Eftersom alle corneae udskæres fra det hele øjeæble og anbringes i corneakamrene, er der risiko for håndteringsforårsagede artefakter i de individuelle værdier for cornea-uklarhed og -permeabilitet (inklusive negativ kontrol). Uklarheds- og permeabilitetsværdierne for de corneae, der fungerer som negativ kontrol, anvendes desuden til at korrigere uklarheds- og -permeabilitetsværdierne for testkemikaliebehandlede og positiv kontrol-behandlede corneae i IVIS-beregningerne.

FREM GANGSMÅDE

Præparering af øjnene

Corneae, som er fri for defekter, fridissekres således, at der stadig er en 2-3 mm sclerakant tilbage til hjælp ved efterfølgende håndtering, idet det tilstræbes at undgå at beskadige cornea-epitelet og -endotelet. Isolerede corneae anbringes i specialdesignede corneaholdere, der består af et forreste og bageste kammer, som grænser op til henholdsvis epitel- og endotelsiden af cornea. Begge kamre fyldes rigeligt op med forvarmet Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) fri for phenolrødt (bageste kammer først), idet det sikres, at der ikke dannes bobler. Derpå bringes anordningen i ligevægt ved 32 ± 1 °C i mindst en time for at gøre det muligt for corneae at komme i ligevægt med mediet og opnå normal metabolisk aktivitet i det omfang, det er muligt (den tilnærmelsesvis temperatur af cornea-overfladen in vivo er 32 °C).

Efter ligevægtsindstillingsperioden tilsættes frisk forvarmet EMEM fri for phenolrødt til begge kamre, og der aflæses basislinje-uklarhed for hver cornea. Alle corneae, som viser makroskopisk vævsbeskadigelse (f.eks. ridser, pigmentering, neovaskularisering) eller en uklarhed på mere end syv uklarhedsenheder eller tilsvarende for det opacitometer og de corneaholdere, der anvendes, kasseres. Mindst tre corneae udvælges som negative kontrolcorneae (eller opløsningsmiddelkontrolcorneae). De resterende corneae fordeles derpå i en behandlingsgruppe og en positiv kontrolgruppe.

Eftersom varmekapaciteten for vand er højere end for luft, giver vand mere stabile temperaturbetingelser til inkubering. Derfor anbefales det at benytte et vandbad til at holde corneaholderen og dens indhold ved 32 ± 1 °C. Der kan dog også anvendes luftinkubatorer under forudsætning af omhyggelig opretholdelse af en stabil temperatur (f.eks. ved forvarmning af holdere og medier).

Påføring af testkemikaliet

Der anvendes to forskellige behandlingsprotokoller — en for væsker og overfladeaktive stoffer (faste stoffer eller væsker) og en for ikke-overfladeaktive stoffer.

Væsker testes ufortyndede. Halvfaste stoffer, cremer og vokser testes typisk som væsker. Rene overfladeaktive stoffer testes ved en koncentration på 10 % vægt/volumen i en 0,9 % natriumchloridopløsning, destilleret vand eller et andet opløsningsmiddel, som påviseligt ikke påvirker testsystemet negativt. Der bør gives passende begrundelse for alternative fortyndingskoncentrationer. Blandinger, der indeholder overfladeaktive stoffer, kan testes ufortyndet eller fortyndet til en passende koncentration, afhængigt af de relevante eksponeringsscenarier in vivo. Der bør gives passende begrundelse for den testede koncentration. Corneae eksponeres for væsker og overfladeaktive stoffer i 10 minutter. Anvendelse af andre eksponeringstider bør ledsages af en tilstrækkelig videnskabelig begrundelse. Der henvises til tillæg 1 for en definition af overfladeaktive stoffer og blandinger indeholdende overfladeaktivt stof.

Ikke-overfladeaktive faste stoffer testes typisk som opløsninger eller opslæmninger ved en koncentration på 20 % vægt/volumen i en 0,9 % natriumchloridopløsning, destilleret vand eller et andet opløsningsmiddel, som påviseligt ikke påvirker testsystemet negativt. Under visse omstændigheder og med behørig videnskabelig begrundelse kan faste stoffer også testes i ren form ved direkte påføring på corneaoverfladen ved anvendelse af metoden med åbent kammer (jf. punkt 32). Corneae eksponeres for faste stoffer i fire timer, men som for væsker og overfladeaktive stoffer kan der anvendes alternative eksponeringstider med en tilstrækkelig videnskabelig begrundelse.

Der kan anvendes forskellige behandlingsmetoder alt efter testkemikaliets fysiske natur og kemiske egenskaber (f. eks. faste stoffer, væsker, viskøse kontra ikke-viskøse væsker). I den forbindelse er det absolut påkrævet at sikre, at testkemikaliets dækker epiteloverfladen tilstrækkeligt, og at det fjernes tilstrækkeligt under skylletrinnene. Der anvendes typisk en metode med lukket kammer for ikke-viskøse til let viskøse flydende testkemikalier, mens der typisk anvendes en metode med åbent kammer for halvviskøse og viskøse flydende testkemikalier og for rene faste stoffer.

Ved metoden med lukket kammer indføres der tilstrækkeligt testkemikalie (750 µl) til at dække cornea-epitelsiden i det forreste kammer gennem doseringshullerne på kammerets overside, og hullerne lukkes efterfølgende med kammerpropperne under eksponeringen. Det er vigtigt at sikre, at hver cornea eksponeres for et testkemikalie i det rette tidsinterval.

Ved metoden med åbent kammer fjernes vindueslåseringen og glasvinduet fra det forreste kammer inden behandling. Kontrol- eller testkemikaliets (750 µl — nok testkemikalie til at dække cornea helt) påføres direkte på cornea-epiteloverfladen ved anvendelse af en mikropipette. Hvis et testkemikalie er vanskeligt at pipettere, kan testkemikaliets fyldes i en pipette med positiv fortrængning under tryk for at lette doseringen. Spidsen på pipetten med positiv fortrængning indsættes i sprøjtes doseringsspid, således at materialet kan fyldes over i fortrængningsspidsen under tryk. Samtidig trykkes sprøjtestemplet ned, efterhånden som pipetestemplet trækkes opad. Hvis der dukker luftbobler op i pipettespiden, fjernes testkemikaliets (det presses ud), og processen gentages, indtil spidsen er fyldt uden luftbobler. Om nødvendigt kan der anvendes en normal sprøjte (uden kanyler), eftersom en sådan sprøjte dels muliggør afmåling af et nøjagtigt volumen testkemikalie og dels letter påføring på cornea-epiteloverfladen. Efter doseringen sættes glasvinduet på plads på det forreste kammer for at genskabe et lukket system.

Inkubering efter eksponering

Efter eksponeringsperioden fjernes testkemikaliets, den negative kontrol eller det positive kontrollkemikalie fra det forreste kammer, og epitelet vaskes mindst tre gange (eller indtil der ikke længere er synlige tegn på testkemikalie) med EMEM (som indeholder phenolrødt). Der anvendes phenolrødt-holdigt medium til skylning, eftersom et farveskift for phenolrødt kan anvendes som indikator for effektiviteten af bortskylning af sure eller basiske testkemikalier. Corneae vaskes mere end tre gange, hvis phenolrødt stadig er misfarvet (gul eller violet), eller hvis testkemikaliets stadig er synligt. Når testkemikaliets er fjernet fra mediet, foretages en afsluttende skylning af corneae med EMEM (uden phenolrødt). EMEM (uden phenolrødt) anvendes til afsluttende skylning for at sikre fjernelse af phenolrødt fra det forreste kammer inden uklarhedsmålingen. Derefter fyldes det forreste kammer igen med frisk EMEM uden phenolrødt.

For væsker eller overfladeaktive stoffer inkuberes corneae efter skylning i yderligere to timer ved 32 ± 1 °C. Længere tid efter eksponering kan være nyttig under visse omstændigheder og kan overvejes i hvert enkelt tilfælde. Corneae, som er behandlet med faste stoffer, skylles grundigt ved afslutningen af den fire timer lange eksponeringsperiode, men kræver ikke yderligere inkubering.

Ved afslutningen af inkubationsperioden efter eksponeringen for væsker og overfladeaktive stoffer og ved afslutningen af den fire timer lange eksponeringsperiode for ikke-overfladeaktive faste stoffer registreres uklarheden og permeabiliteten for hver cornea. Desuden observeres hver cornea visuelt, og væsentlige observationer registreres (f.eks. vævsafskalning, resterende testkemikalie, uensartede uklarhedsmønstre). Disse observationer kan være vigtige, da de kan give sig udslag i variationer i opacitometer aflæsningerne.

Kontrollkemikalier

Der indgår samtidige negative kontroller eller opløsningsmiddel/bærestof-kontroller og positive kontroller i hvert forsøg.

Ved test af et flydende stof i en koncentration på 100 % medtages der ved BCOP-forsøgsmetoden en samtidig negativ kontrol (f.eks. 0,9 % natriumchloridopløsning eller destilleret vand), således at der kan påvises ikke-specifikke ændringer i testsystemet og opnås en basislinje for assayets endepunkter. Det sikrer også, at assaybetingelserne ikke fejlagtigt resulterer i en irritationsrespons.

Ved test af fortyndet væske, overfladeaktivt stof eller fast stof medtages der i BCOP-forsøgsmetoden en samtidig opløsningsmiddel/bærestof-kontrolgruppe, således at der kan påvises ikke-specifikke ændringer i testsystemet og opnås en basislinje for assayets endepunkter. Kun et opløsningsmiddel/bærestof, som påviseligt ikke påvirker testsystemet negativt, kan anvendes.

Et kemikalie, som vides at fremkalde en positiv respons, indgår som en sideløbende positiv kontrol i hvert forsøg for at verificere integriteten af testsystemet og dets korrekte udførelse. For at sikre at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør irritationsresponsen imidlertid ikke være overdrevent stor.

Eksempler på positive kontroller for flydende testkemikalier er 100 % ethanol eller 100 % dimethylformamid. Et eksempel på en positiv kontrol for faste testkemikalier er 20 % vægt/volumen imidazol i 0,9 % natriumchloridopløsning.

Referencekemikalier er nyttige i forbindelse med vurdering af øjenirritationspotentialer for ukendte kemikalier i en særlig kemikalie- eller produktgruppe eller vurdering af det relative irritationspotential for et øjenirriterende stof inden for et specifikt område af irritationsresponsen.

Målte endepunkter

Uklarhed bestemmes ud fra mængden af lystransmission gennem cornea. Cornea-uklarhed måles kvantitativt ved hjælp af et opacitometer, hvorved der opnås ukklarhedsværdier målt på en kontinuert skala.

Permeabilitet bestemmes ud fra mængden af farvestoffet natriumfluorescein, der trænger gennem alle corneacellelag (dvs. fra epitelet på den udvendige cornea-overflade til endotelet på den indvendige cornea-overflade). Der tilsættes 1 ml natriumfluoresceinopløsning (henholdsvis 4 mg/ml ved test af væsker og overfladeaktive stoffer og 5 mg/ml ved test af ikke-overfladeaktive faste stoffer) til det forreste kammer i corneaholderen, som grænser op til epitelsiden af cornea, mens det bageste kammer, som grænser op til endotelsiden af cornea, fyldes med frisk EMEM. Derpå inkuberes holderen i vandret position i 90 ± 5 min. ved 32 ± 1 °C. Mængden af natriumfluorescein, der kommer ind i det bageste kammer, måles kvantitativt ved hjælp af UV/VIS-spektrofotometri. Spektrofotometriske målinger vurderet ved 490 nm registreres som OD490 (OD = optisk tæthed) eller absorbansværdier, som måles på en kontinuert skala. Fluoresceinpermeabilitetsværdierne bestemmes ved anvendelse af OD490-værdier, som er opnået med et spektrofotometer til synligt lys ved brug af en standardvejlængde på 1 cm.

Der kan alternativt anvendes en aflæser til en mikrotiterplade med 96 brønde, forudsat at i) pladeaflæserens lineære interval for bestemmelse af fluorescein-OD490-værdier kan fastlægges; og at ii) volumen af fluoresceinprøverne i pladen med 96 brønde er korrekt, således at der opnås OD490-værdier svarende til standardvejlængden på 1 cm (dette kan kræve en helt fuld brønd [sædvanligvis 360 µl]).

DATA OG RAPPORTERING

Datavurdering

Efter at ukklarhedsværdier og gennemsnitlige permeabilitetsværdier (OD490-værdier) er korrigeret for baggrundsklarhed og permeabilitets-OD490-værdierne for den negative kontrol, bør den gennemsnitlige ukklarhedsværdi og den gennemsnitlige permeabilitets-OD490-værdi for hver behandlingsgruppe kombineres i en empirisk udledt formel for at beregne en in vitro-irritationsscore (IVIS) for hver behandlingsgruppe som følger:

$$\text{IVIS} = \text{gennemsnitlig ukklarhedsværdi} + (15 \times \text{gennemsnitlig permeabilitets-OD490-værdi})$$

Sina et al. (16) rapporterede, at denne formel blev udledt under interne og sammenlignende laboratorieundersøgelser. Data genereret for i alt 36 forbindelser i en undersøgelse med deltagelse af flere laboratorier blev underkastet flerdimensional analyse for at bestemme ligningen for bedste fit mellem in vivo- og in vitro-data. Denne analyse blev udført af forskere i to forskellige virksomheder, som udledte næsten identiske ligninger.

Uklarheds- og permeabilitetsværdierne bør også vurderes uafhængigt for at fastslå, om et testkemikalie kun inducerer ætsning eller stærk irritation ud fra et af de to endepunkter (jf. Beslutningskriterier).

Beslutningskriterier

IVIS-cut-off-værdier for identificering af testkemikalier, som medfører alvorlig øjenskade (UN GHS-kategori 1), og testkemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade (UN GHS uden for kategori) er angivet nedenfor:

IVIS	UN GHS
≤ 3	Uden for kategori
$> 3; \leq 55$	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser
> 55	Kategori 1

Undersøgelsesacceptkriterier

En test betragtes som acceptabel, hvis den positive kontrol giver en IVIS, der ligger inden for to standardafvigelser fra det aktuelle historiske gennemsnit, som skal ajourføres mindst hver tredje måned eller hver gang, der gennemføres en acceptabel test på laboratorier, hvor der sjældent gennemføres test (dvs. sjældnere end en gang om måneden). Negative eller opløsningsmiddel/bærestof-kontrolresponser bør resultere i uklarheds- og permeabilitetsværdier, der er mindre end de fastsatte øvre grænser for baggrundsuklarheds- og -permeabilitetsværdier for oksecorneae behandlet med den respektive negative kontrol eller opløsningsmiddel/bærestof-kontrol. En analyseserie bestående af mindst tre corneae bør være tilstrækkelig for et testkemikalie, når klassificeringsresultatet er entydigt. I tilfælde af tvetydige resultater i den første test bør det imidlertid overvejes at gennemføre endnu en analyseserie (men dette er ikke nødvendigvis påkrævet), samt en tredje i tilfælde af diskordante gennemsnitlige IVIS-resultater af de første to test. I denne forbindelse betragtes et resultat i den første test som tvetydigt, hvis forudsigelserne fra de tre corneae var diskordante, således at:

- to af de tre corneae gav diskordante forudsigelser i forhold til gennemsnittet af alle tre corneae, eller
- en af de tre corneae gav en diskordant forudsigelse i forhold til gennemsnittet af alle tre corneae, og det diskordante resultat var > 10 IVIS-enheder fra tærsklen på 55.
- Hvis den gentagne test støtter forudsigelsen fra den indledende test (baseret på den gennemsnitlige IVIS-værdi), kan der træffes en endelig beslutning uden yderligere test. Hvis resultatet af den gentagne test er en diskordant forudsigelse i forhold til den indledende test (baseret på den gennemsnitlige IVIS-værdi), bør der gennemføres en tredje og sidste test for at nå frem til en entydig forudsigelse og klassificere testkemikallet. Det kan være tilladt at give afkald på yderligere test med henblik på klassificering og mærkning, hvis en test giver en forudsigelse om UN GHS-kategori 1.

Testrapport

Testrapporten bør omfatte følgende oplysninger, hvis de er relevante for undersøgelsens gennemførelse:

Test- og kontrolkemikalier

- Kemisk(e) navn(e), såsom det strukturnavn, der anvendes af Chemical Abstracts Service (CAS), efterfulgt af andre navne, hvis sådanne kendes; CAS-registreringsnummer (RN), hvis dette kendes

- Renhed og sammensætning af test-/kontrolkemikalier (i vægtprocent) i det omfang, disse oplysninger er tilgængelige
- fysisk-kemiske egenskaber, såsom fysisk tilstand, flygtighed, pH, stabilitet, kemikaliegruppe og vandopløselighed, som er relevante for undersøgelsens gennemførelse
- eventuel behandling af test-/kontrolkemikalier inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)
- stabilitet, hvis den kendes.

Oplysninger om sponsor og testfacilitet

- navn og adresse på sponsoren, testfaciliteten og undersøgelseslederen.

Betingelser for forsøgsmetoden

- anvendt opacitometer (f.eks. model og specifikationer) og indstillinger
- kalibreringsoplysninger for udstyr anvendt til måling af uklarhed og permeabilitet (f.eks. opacitometer og spektrofotometer) for at sikre lineære målinger
- anvendt type corneaholdere (f.eks. model og specifikationer)
- beskrivelse af andet anvendt udstyr
- den procedure, som anvendes til at sikre integriteten (dvs. nøjagtighed og pålidelighed) af forsøgsmetoden over tid (f.eks. periodisk test af kompetencekemikalier).

Kriterier for en acceptabel test

- acceptable samtidige positive og negative kontrolintervaller på grundlag af historiske data
- acceptable samtidige referencekontrolintervaller på grundlag af historiske data, hvis det er relevant.

Indsamling og præparering af øjne

- identifikation af kilden til øjnene (dvs. den facilitet, hvor de er indsamlet)
- corneadiameter som mål for kildedyrets alder og egnethed til assayet
- opbevarings- og transportbetingelser for øjnene (f.eks. dato og klokkeslæt for indsamling af øjnene, tidsinterval inden påbegyndelse af test, transportmedier og temperaturbetingelser, eventuelle anvendte antibiotika)
- præparering og montering af oksecorneae, herunder specifikation af deres kvalitet, temperatur af corneaholdere og kriterierne for udvælgelse af de corneae, der anvendes til test.

Testprocedure

- antal benyttede replikater
- identiteten af de anvendte positive og negative kontroller (hvor dette er relevant også opløsningsmiddel- og benchmarkkontroller)
- testkemikaliets koncentration(er), anvendelse, eksponeringstid og inkubationstid efter eksponering
- beskrivelse af de anvendte vurderings- og beslutningskriterier
- beskrivelse af de benyttede undersøgelsesacceptkriterier
- beskrivelse af eventuelle ændringer i testproceduren
- beskrivelse af de anvendte beslutningskriterier.

Resultater

- angivelse i tabelform af data fra hver enkelt testprøve (f.eks. uklarheds- og OD490-værdier og beregnet IVIS for testkemikaliets og de positive kontroller, negative kontroller og referencekontrollerne [hvis de er medtaget] rapporteret i tabelform, herunder data fra flergangsbestemmelser/gentagne bestemmelser, hvis det er relevant, og gennemsnit $\pm$ standardafvigelsen for hvert forsøg)
- beskrivelse af andre observerede virkninger
- den afledte in vitro-klassificering ifølge UN GHS, hvor det er relevant.

*Diskussion af resultaterne**Konklusion*

LITTERATUR

- (1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report — *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Tilgængelig på: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.
- (2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No.10-7553. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Tilgængelig på: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>.
- (3) OECD (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, No.189, OECD, Paris.
- (4) UN (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York and Geneva: De Forenede Nationer. Tilgængelig på: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.
- (5) 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., and 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.
- (6) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. I: ICCVAM Test Method Evaluation Report — *in vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Tilgængelig på: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.
- (7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. I: ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Tilgængelig på: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>.
- (8) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay — SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italien: Europæisk Center for Validering af Alternative Metoder (ECVAM).
- (9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

- (10) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in Vitro* 20:78-81.
- (11) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Tilgængelig på: [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf>].
- (12) Maurer, J.K., Parker, R.D. and 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.
- (13) OECD (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Series on Testing and Assessment, No. 160. Adopted October 25, 2011. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- (14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.
- (15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on — Part I. *The Lancet* 349: 636-641.
- (16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam. Appl. Toxicol.* 26:20-31.
- (17) Kapitel B.5 i dette bilag, Akut øjenirritation/-ætsning.
- (18) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Tilgængelig på: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].
- (19) OECD (1998). Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. No. 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised in 1997).

Tilgængelig på: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

Tillæg 1

DEFINITIONER

Nøjagtighed: Overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af »relevans«. Udtrykket benyttes ofte som synonym for »konkordans«, forstået som den andel af korrekte udfald, forsøgsmetoden fører til.

Benchmarkkemikalie: Et kemikalie, der anvendes som standard til sammenligning med et testkemikalie. Et benchmarkkemikalie skal have følgende egenskaber: i) en eller flere ensartede og pålidelige kilder, ii), strukturel og funktionel lighed med den klasse af kemikalier, der testes, iii) kendte fysisk-kemiske egenskaber, iv) støttedata om kendte virkninger og v) kendt styrke i det ønskede responsområde

Bottom-up-tilgang: Trinvis tilgang til et kemikalie mistænkt for ikke at kræve klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade, der starter med bestemmelse af kemikalier, som ikke kræver klassifikation (negativt resultat) fra andre kemikalier (positivt resultat).

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

Cornea: Den transparente del af øjeæblets forside, som dækker øjets iris og pupil, og hvorigennem lys kommer ind i øjets indre.

Cornea-uklarhed: Måling af graden af cornea-ugennemsigtighed efter eksponering for et testkemikalie. Øget cornea-uklarhed er indikativt for beskadigelse af cornea. Uklarhed kan vurderes subjektivt som i Draize-kaninøjentesten eller objektivt med et instrument, såsom et »opacitometer«.

Corneapermeabilitet: Kvantitativ måling af beskadigelsen af cornea-epitelet ud fra bestemmelse af mængden af farvestoffet natriumfluorescein, der trænger gennem alle corneacellelag.

Øjenirritation: Frembringelse af forandringer i øjet, som opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade, og som er fuldt reversibel inden for 21 dage efter påføring. Udskiftelige med »Reversible virkninger på øjet« og »UN GHS-kategori 2« (4).

Falsk negativ-rate: Den andel af alle positive kemikalier, som ved en forsøgsmetode fejlagtigt identificeres som negative. Dette er en indikator for forsøgsmetodens ydeevne.

Falsk positiv-rate: Den andel af alle negative kemikalier, som ved en forsøgsmetode fejlagtigt identificeres som positive. Dette er en indikator for forsøgsmetodens ydeevne.

Fare: Den iboende egenskab ved et middel eller en situation, som kan forårsage skade, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende middel.

In vitro-irritationsscore (IVIS): En empirisk udledt formel, som anvendes i BCOP-forsøgsmetoden, og hvorved den gennemsnitlige uklarhedsværdi og den gennemsnitlige permeabilitetsværdi for hver behandlingsgruppe kombineres i en enkelt in vitro-score for hver behandlingsgruppe. $IVIS = \text{gennemsnitlig uklarhedsværdi} + (15 \times \text{gennemsnitlig permeabilitetsværdi})$.

Irreversible virkninger på øjet: Se »Alvorlig øjenskade«.

Blanding: En blanding eller opløsning, der er sammensat af to eller flere stoffer, hvori de ikke reagerer (4).

Negativ kontrol: Et ubehandlet replikat, som indeholder alle komponenter fra et testsystem. Prøven behandles sammen med prøver behandlet med testkemikaliets og andre kontrolprøver for at afgøre, hvorvidt opløsningsmidlet interagerer med testsystemet.

Ikke klassificeret: Kemikalier, der ikke er klassificeret for øjenirritation (UN GHS-kategori 1) eller alvorlig øjenskade (UN GHS-kategori 2). Udskiftelige med »UN GHS uden for kategori«.

Opacitometer: Et instrument, som anvendes til at måle »cornea-uklarhed« ved kvantitativ vurdering af **lystransmission gennem cornea**. Det typiske instrument har to kamre, som hver har sin egen lyskilde og fotocelle. Det ene kammer anvendes til den behandlede cornea, mens det andet anvendes til at kalibrere og nulstille instrumentet. Lys fra en halogenlampe sendes gennem et kontrolkammer (et væsketomt kammer uden vinduer) til en fotocelle og sammenlignes med det lys, som er sendt gennem forsøgs-kammeret, som rummer kammeret med cornea, til en fotocelle. Forskellen i lystransmission fra fotocellerne sammenlignes, og der vises en numerisk uklarhedsværdi på et digitalt display.

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

Reversible virkninger på øjet: Se »Øjenirritation«.

Pålidelighed: Mål for, i hvilken grad en forsøgsmetode kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og repeterbarhed inden for laboratorier.

Alvorlig øjenskade: Frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsættelse, som opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter påføring. Udskiftelig med »Irreversible virkninger på øjet« og »UN GHS-kategori 1« (4).

Opløsningsmiddel/bærestof-kontrol: En ubehandlet prøve, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem, herunder opløsningsmidlet eller bærestoffet, og som behandles sammen med de testkemikaliebehandlede prøver og andre kontrolprøver for at fastlægge basislinjeresponsen for de prøver, som er behandlet med testkemikaliets opløst i det samme opløsningsmiddel eller bærestof. Når denne prøve testes med en samtidig negativ kontrol, viser den også, hvorvidt opløsningsmidlet eller bærestoffet interagerer med testsystemet.

Stof: Grundstoffer og forbindelser heraf, naturlige eller industrielt fremstillede, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, som kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning (4).

Overfladeaktivt stof (surfactant): Også kaldet overfladeaktivt stof. Et stof, f.eks. et vaske- og rengøringsmiddel, der kan reducere overfladespændingen i en væske og dermed give den mulighed for at skumme eller trænge gennem faste stoffer. Kaldes også for befugtningsmiddel.

Blanding indeholdende overfladeaktivt stof: I forbindelse med denne forsøgsmetode en blanding, der indeholder et eller flere overfladeaktive stoffer i en endelig koncentration på > 5 %.

Top-down-tilgang: Trinvis tilgang, der anvendes for et kemikalie, som mistænkes for at forårsage alvorlig øjenskade, der starter med bestemmelse af kemikalier, som forårsager alvorlig øjenskade (positivt resultat), i forhold til andre kemikalier (negativt resultat).

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

Trindelt teststrategi: Ved anvendelse af den trinvis teststrategi gennemgås alle eksisterende oplysninger om et testkemikalie i en bestemt rækkefølge ved anvendelse af en weight-of-the-evidence-proces på hvert trin for at fastslå, om der foreligger tilstrækkelige oplysninger til at træffe en fareklassificeringsafgørelse, inden der fortsættes til næste trin. Hvis et testkemikalies irritationspotentiale kan underbygges baseret på eksisterende oplysninger, er der ikke behov for at foretage yderligere test. Hvis et testkemikalies irritationspotentiale ikke kan underbygges baseret på eksisterende oplysninger, foretages en trindelt sekventiel dyreforsøgsprocedure, indtil der kan foretages en utvetydig klassificering.

De Forenede Nationers globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals — UN GHS): Et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, risikosætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljø (4).

UN GHS-kategori 1: Se »Alvorlig øjenskade«.

UN GHS-kategori 2: Se »Øjenirritation«.

UN GHS uden for kategori: Kemikalier, der ikke opfylder kravene med hensyn til klassificering som UN GHS-kategori 1 eller 2 (2A eller 2B). Udskiftelig med »Ikke-klassificeret«.

Valideret forsøgsmetode: En forsøgsmetode, for hvilken der er gennemført valideringsundersøgelser for at fastslå relevansen (herunder nøjagtigheden) og pålideligheden til et bestemt formål. Det er vigtigt at være opmærksom på, at en valideret forsøgsmetode måske ikke har tilstrækkelig ydeevne med hensyn til nøjagtighed og pålidelighed til at være acceptabel til det planlagte formål.

»Weight-of-the-evidence«: En proces, hvor styrkerne og svaghederne ved forskellige oplysninger afvejes for at nå frem til og underbygge en konklusion om et testkemikalies farepotentiale.

Tillæg 2

BCOP-FORSØGSMETODENS FORUDSIGELSESEVNE

Tabel 1

BCOP's forudsigelsesevne til at identificere kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade [UN GHS/EU CLP-kat 1 mod ikke kat 1 (kat 2 + uden for kat); US EPA-kat I mod ikke kat I (kat II + kat III + kat IV)]

Klassifiserings-system	Antal	Nøjagtighed		Følsomhed		Falsk negativ		Specificitet		Falsk positiv	
		%	Antal	%	Antal	%	Antal	%	Antal	%	Antal
UN GHS	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
EU CLP											
US EPA	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Tabel 2

BCOP's forudsigelsesevne til at identificere kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade (»ikke-øjenirriterende«) [UN GHS/ EU CLP uden for kat mod ikke uden for kat (kat 1 + kat 2); US EPA kat IV mod ikke kat IV (kat I + kat II + kat III)]

Klassifiserings-system	Antal	Nøjagtighed		Følsomhed		Falsk negativ		Specificitet		Falsk positiv	
		%	Antal	%	Antal	%	Antal	%	Antal	%	Antal
UN GHS	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
EU CLP											
US EPA	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

Tillæg 3

KOMPETENCEKEMIKALIER TIL BCOP-FORSØGSMETODEN

Inden laboratorier påbegynder rutinemæssig brug af denne forsøgsmetode, bør de godtgøre deres tekniske kompetence ved korrekt identifikation af øjenrisikoklassificeringen for de 13 anbefalede kemikalier i tabel 1. Disse kemikalier er udvalgt således, at de repræsenterer det responsområde for øjenrisiko, der er baseret på resultater fra in vivo-kaninøjentesten (TG 405) (17) og UN GHS-klassificeringssystemet (dvs. UN GHS-kategori 1, 2A, 2B eller uden for kategori) (4). Andre udvælgelseskriterier var, at kemikalierne er kommercielt tilgængelige, at der er tilgængelige in vivo-referencedata af høj kvalitet, og at der findes in vitro-data af høj kvalitet for BCOP-forsøgsmetoden. Referencedata findes i SSD (Streamlined Summary Document) (3) og i ICCVAM Background Review Document for BCOP-forsøgsmetoden (2) (18).

Tabel 1

Anbefalede kemikalier til godtgørelse af teknisk kompetence i anvendelse af BCOP-forsøgsmetoden

Kemikalie	CAS-registrenummer	Kemikaliegruppe ⁽¹⁾	Fysisk form	In vivo-klassificering ⁽²⁾	BCOP-klassificering
Benzalkoniumchlorid (5 %)	8001-54-5	Oniumforbindelse	Flydende	Kategori 1	Kategori 1
Chlorhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Fast	Kategori 1	Kategori 1
Dibenzoyl-L-vinsyre	2743-38-6	Carboxylsyre, ester	Fast	Kategori 1	Kategori 1
Imidazol	288-32-4	Heterocyklisk	Fast	Kategori 1	Kategori 1
Trichloreddikesyre (30 %)	76-03-9	Carboxylsyre	Flydende	Kategori 1	Kategori 1
2,6-dichlorbenzoylchlorid	4659-45-4	Acylhalogenid	Flydende	Kategori 2A	Der kan ikke foretages en præcis/pålidelig forudsigelse
Ethyl-2-methylacetat	609-14-3	Keton, ester	Flydende	Kategori 2B	Der kan ikke foretages en præcis/pålidelig forudsigelse
Ammoniumnitrat	6484-52-2	Uorganisk salt	Fast	Kategori 2 ⁽³⁾	Der kan ikke foretages en præcis/pålidelig forudsigelse
EDTA, dikaliumsalt	25102-12-9	Amin, carboxylsyre (salt)	Fast	Ikke klassificeret	Ikke klassificeret
Tween 20	9005-64-5	Ester, polyether	Flydende	Ikke klassificeret	Ikke klassificeret

Kemikalie	CAS-registreringsnummer	Kemikaliegruppe ⁽¹⁾	Fysisk form	In vivo-klassificering ⁽²⁾	BCOP-klassificering
2-mercaptopyrimidin	1450-85-7	Acylhalogenid	Fast	Ikke klassificeret	Ikke klassificeret
Phenylbutazon	50-33-9	Heterocyklisk	Fast	Ikke klassificeret	Ikke klassificeret
Polyoxyethylen-23-laurylether (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Alkohol	Flydende	Ikke klassificeret	Ikke klassificeret

Forkortelser: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number

⁽¹⁾ Kemikaliegrupperne for hvert testkemikalie blev fastsat ved anvendelse af et standardklassificeringsskema baseret på National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH)-klassificeringssystemet (se følgende websted: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ Baseret på resultater fra in vivo-kaninøjentesten (OECD TG 405) (17) og brug af UN GHS (4).

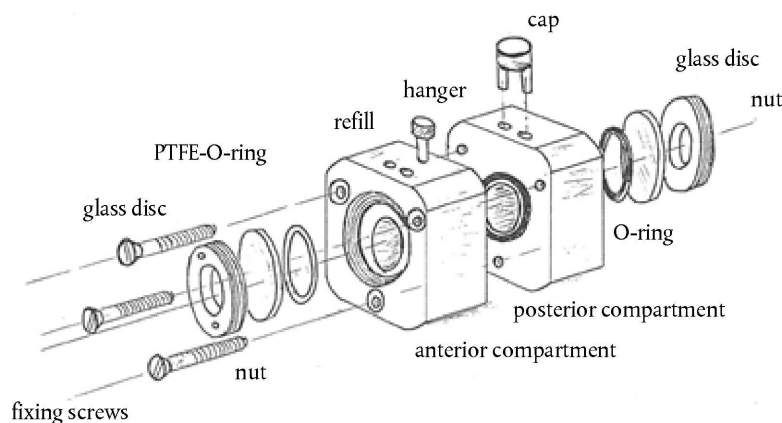
⁽³⁾ Klassificering som 2A eller 2B afhænger af fortolkningen af UN GHS-kriteriet for at skelne mellem disse to kategorier, dvs. et ud af tre mod to ud af tre dyr med virkninger på dag 7, som er nødvendige for at skabe en kategori 2A-klassifikation. In vivo-undersøgelsen omfattede tre dyr. Alle endepunkter bortset fra conjunctiva-rødme hos et dyr, der opnåede en bedring til en score på nul på dag 7 eller tidligere. Den ene dyr, som ikke var i fuld bedring på dag 7, havde en score for conjunctiva-rødme på 1 (på dag 7) med fuld bedring på dag 10.

Tillæg 4

BCOP-CORNEAHOLDEREN

BCOP-corneaholderne er fremstillet af et inaktivt materiale (f.eks. polypropylen). Holderne består af to halvdele (et forreste og et bageste kammer) og har to ens cylindriske indre kamre. Hvert kammer kan rumme et volumen på ca. 5 ml og er afgrænset af et glasvindue, gennem hvilket der foretages uklarhedsmålinger. Hvert indre kammer har en diameter på 1,7 cm og en dybde på 2,2 cm ⁽¹⁾. Der er anbragt en o-ring på det bageste kammer for at forhindre lækager. Corneae anbringes med endotelsiden nedad på de bageste kamres o-ring, og de forreste kamre anbringes på epitelsiden af corneae. Kamrene holdes på plads med tre skruer af rustfrit stål, som er placeret på de udvendige kammerkanter. Der er placeret et glasvindue for enden af hvert kammer, som kan fjernes, så der er let adgang til cornea. Der er også anbragt en o-ring mellem glasvinduet og kammeret for at forhindre lækager. To huller på hvert kammers overside muliggør tilførsel og fjernelse af medium og testkemikalier. De er lukket med gummihætter under behandling og inkubering. Lystransmissionen gennem corneaholdere kan ændres, da virkningerne af slitage eller ophobning af specifikke kemikalierester på det indre kammers huller eller på glasvinduerne kan påvirke lysspredning eller reflektans. Som følge heraf kan der forekomme stigninger eller fald i basislinjelystransmission (og omvendt i basislinjeuklarhedsaflysninger) gennem corneaholderne, og dette kan vise sig som markante ændringer i de forventede indledende basislinjemålinger af cornea-uklarhed i de enkelte kamre (dvs. de indledende værdier for cornea-uklarhed i specifikke corneaholdere kan rutinemæssigt afvige mere end to eller tre uklarhedsenheder fra de forventede basislinjeværdier). Hvert laboratorium bør overveje at oprette et program til evaluering af ændringer i lystransmission gennem corneaholdere, afhængigt af arten af de testede kemikalier og hvor hyppigt kamrene anvendes. For at fastlægge basislinjeværdier kan corneaholdere kontrolleres før rutinemæssig brug ved at måle baselinjeværdier for uklarhed (eller lystransmission) i kamre fyldt med komplet medium uden corneae. Corneaholderne kontrolleres derefter med jævne mellemrum for ændringer i lystransmissionen i de anvendte perioder. Hvert laboratorium kan fastsætte hyppigheden for kontrol af corneaholdere baseret på de testede kemikalier, hyppigheden af brug og observationer af ændringer i basislinjeværdierne for cornea-uklarhed. Hvis der observeres markante ændringer i lystransmissionen gennem corneaholderne, må det overvejes at gennemføre egnede rengørings- og/eller poleringsprocedurer for den indvendige overflade af corneaholderne eller foretage udskiftning.

Corneaholder: eksploderet diagram



⁽¹⁾ De angivne dimensioner gælder for en corneaholder, som anvendes til køer i alderen fra 12 til 60 måneder. Hvis der anvendes dyr i alderen fra 6 til 12 måneder, vil holderen i stedet skulle konstrueres således, at hvert kammer kan rumme et volumen på 4 ml, og hvert af de indre kamre har en diameter på 1,5 cm og en dybde på 2,2 cm. For enhver nykonstrueret corneaholder er det meget væsentligt, at forholdet mellem det eksponerede corneaoverfladeareal og det bageste kammers volumen er det samme som forholdet i den traditionelle corneaholder. Det er nødvendigt for at sikre, at permeabilitetsværdierne bestemmes korrekt til beregning af IVIS ved hjælp af den foreslåede formel.

Tillæg 5

OPACITOMETERET

Opacitometeret er en anordning til måling af lystransmission. Ved det OP-KIT-udstyr fra Electro Design (Riom, Frankrig), der anvendes til validering af BCOF-forsøgsmetoden, sendes lys fra en halogenlampe gennem et kontrolkammer (et væsketomt kammer uden vinduer) til en fotocelle og sammenlignes med det lys, som er sendt gennem forsøgskammeret, som rummer kammeret med cornea, til en fotocelle. Forskellen i lystransmission fra fotocellerne sammenlignes, og der vises en numerisk uklarhedsværdi på et digitalt display. Uklarhedsenhederne fastlægges. Andre typer opacitometer med en anden opsætning (der f.eks. ikke kræver parallelle målinger af kontrol- og forsøgskammer) kan anvendes, hvis de har vist sig at give samme resultater som det validerede udstyr.

Opacitometeret bør give en lineær respons for en række uklarhedsaflysninger, som omfatter de til de forskellige klassificeringer anvendte tærskelværdier, som er beskrevet med den anvendte Prediction Model (dvs. op til den tærskelværdi, som er bestemmende for klassificering som ætsning/stærk irritation). For at sikre lineære og nøjagtige aflæsninger op til 75-80 uklarhedsenheder er det nødvendigt at kalibrere opacitometeret ved hjælp af en række kalibratorer. Kalibratorerne anbringes i kalibreringskammeret (et corneakammer, som er konstrueret til at rumme kalibratorerne), hvorefter opacitometeret aflæses. Kalibreringskammeret er konstrueret til at rumme kalibratorerne i ca. samme position mellem lyset og fotocellen, som corneae vil blive anbragt i under uklarhedsmålingerne. Referenceværdier og indledende opsætning afhænger af, hvilken type udstyr der anvendes. Lineariteten af uklarhedsmålingerne bør sikres ved passende (instrumentspecifikke) procedurer. Til OP-KIT-udstyret fra Electro Design (Riom, Frankrig) kalibreres opacitometeret f.eks. først til 0 uklarhedsenheder ved anvendelse af kalibreringskammeret uden kalibrator. Derpå anbringes tre forskellige kalibratorer en efter en i kalibreringskammeret, og uklarhederne måles. Kalibrator 1, 2 og 3 bør give uklarhedsaflysninger svarende til deres forudfastsatte værdier på henholdsvis 75, 150 og 225 uklarhedsenheder $\pm 5\%$.

13) Del B, kapitel B.48, affattes således:

»B.48 Isoleret kyllingeøje-forsøgsmetode til identifikation af i) kemikalier, der fremkalder alvorlig øjenskade og ii) kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline (TG)) 438 (2013). Isoleret kyllingeøje-forsøgsmetoden blev evalueret af Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) sammen med Det Europæiske Center for Validering af Alternative Metoder (ECVAM) og Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) i 2006 og 2010 (1) (2) (3). I den første evaluering blev ICE godkendt som en videnskabeligt gyldig forsøgsmetode til brug som screeningtest til identifikation af kemikalier (stoffer og blandinger), der medfører alvorlig øjenskade (kategori 1) som defineret i FN's globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (UN GHS) (1) (2) (4) og forordning (EF) nr. 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP-forordningen) ⁽¹⁾. I den anden evaluering blev ICE-forsøgsmetoden evalueret med henblik på brug som screeningtest til identifikation af kemikalier, der ikke er klassificeret for øjenirritation eller alvorlig øjenskade som defineret i UN GHS (3) (4). Resultaterne af valideringsundersøgelserne og peer review-panelets anbefalinger opretholdt den oprindelige anbefaling om at bruge ICE til klassificering af kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade (UN GHS-kategori 1), eftersom den tilgængelige database var uændret siden den oprindelige ICCVAM-validering. På det tidspunkt blev der ikke foreslået yderligere anbefalinger om at udvide ICE's anvendelsesområde (domæne) til også at omfatte andre kategorier. Der blev foretaget en revurdering af in vitro- og in vivo-datasættet, der blev anvendt i valideringsundersøgelsen, med fokus på at vurdere, om ICE kunne anvendes til at identificere kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade (5). Konklusionen på revurderingen var, at ICE-forsøgsmetoden også kan anvendes til at

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

identificere kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation og alvorlig øjenskade som defineret af UN GHS (4) (5). Forsøgsmetoden omfatter den anbefalede anvendelse og begrænsninger af ICE-forsøgsmetoden baseret på disse evalueringer. De vigtigste forskelle mellem den oprindelige version fra 2009 og den ajourførte version fra 2013 af OECD's vejledning omfatter, men er ikke begrænset til, brug af ICE-forsøgsmetoden til at identificere kemikalier, der ikke kræver klassificering i henhold til UN GHS-klassificeringssystemet, en ajourføring af testrapportens elementer, en ajourføring af tillæg 1 om definitioner og en ajourføring af tillæg 2 om kompetencekemikalierne.

I dag er det generelt accepteret, at der i den nærmeste fremtid ikke vil være en enkelt in vitro-øjenirritationstest, der vil kunne erstatte in vivo-Draize-øjentesten til forudsigelse af hele spektret af irritation for forskellige kemikaliegrupper. Strategiske kombinationer af flere alternative forsøgsmetoder i en (trinvis) teststrategi kan dog muligvis erstatte Draize-øjentesten (6). Top-down-tilgangen (7) er beregnet til at skulle anvendes, hvor et kemikalie på grund af eksisterende oplysninger ventes at have et højt irritationspotentiale, mens bottom-up-tilgangen (7) er beregnet til at skulle anvendes, hvor et kemikalie på grund af eksisterende oplysninger ikke ventes at forårsage tilstrækkelig øjenirritation til at kræve en klassificering. ICE-forsøgsmetoden er en in vitro-forsøgsmetode, som kan anvendes under visse omstændigheder og med særlige begrænsninger som beskrevet i punkt 8 til 10 for klassificering af risikoen for øjenskader og mærkning af kemikalier. Selv om den ikke betragtes som gyldig som enkeltstående erstatning for in vivo-kaninøjentesten, anbefales ICE-forsøgsmetoden som første trin i en teststrategi såsom top-down-tilgangen som anført af Scott et al. (7) til at identificere kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade, dvs. kemikalier, der skal klassificeres som UN GHS-kategori 1 uden yderligere test (4). ICE-forsøgsmetoden anbefales også til at identificere kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade, som defineret i UN GHS (uden for kategori), og kan derfor anvendes som det indledende trin i en bottom-up-tilgang (7). Et kemikalie, der ikke forudses at forårsage alvorlig øjenskade eller som ikke er klassificeret for øjenirritation/alvorlig øjenskade med ICE-forsøgsmetoden, vil kræve yderligere test (in vitro og/eller in vivo), for at den endelige klassificering kan fastslås. Desuden bør de relevante kompetente myndigheder høres, før ICE anvendes i en bottom-up-tilgang i henhold til andre klassifikationsordninger end UN GHS.

Formålet med denne forsøgsmetode er at beskrive de procedurer, som anvendes til at vurdere et testkemikalies potentielle risiko for at forårsage øjenskade som målt ved dets evne til at inducere toksicitet i et enukleeret kyllingeøje. Toksiske virkninger på cornea måles ved i) en kvalitativ vurdering af uklarhed, ii) en kvalitativ vurdering af epitelbeskadigelse på grundlag af påføring af fluorescein på øjet (fluoresceinretention), iii) en kvantitativ måling af øget tykkelse (opsvulmning) og iv) en kvalitativ vurdering af makroskopisk morfologisk overfladebeskadigelse. Vurderingerne af cornea-uklarhed, -opsvulmning og -beskadigelse efter eksponering for et testkemikalie evalueres individuelt, hvorefter de kombineres til udledning af en Eye Irritancy Classification (øjenirritationsklassificering).

Definitioner findes i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

Denne forsøgsmetode er baseret på den foreslåede protokol i OECD's vejledning 160 (8), som blev udviklet efter den internationale ICCVAM-valideringsundersøgelse (1) (3) (9) med bidrag fra Det Europæiske Center for Validering af Alternative Metoder, Japanese Center for the Validation of Alternative Methods og TNO Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology (Nederlandene). Protokollen er baseret på oplysninger fra offentliggjorte protokoller, såvel som TNO's aktuelt anvendte protokol (10) (11) (12) (13) (14).

Der er blevet testet en lang række forskellige kemikalier i forbindelse med valideringen af denne forsøgsmetode, og den empiriske database for valideringsundersøgelsen omfatter 152 kemikalier i alt, herunder 72 stoffer og 80 blandinger (5). Forsøgsmetoden anvendes på faste stoffer, væsker, emulsioner og geler. Væsker kan være vandige eller ikke-vandige, og faste stoffer kan være opløselige eller uopløselige i vand. Gasser og aerosoler er endnu ikke vurderet ved en valideringsundersøgelse.

ICE-forsøgsmetoden kan anvendes til at identificere kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade, dvs. kemikalier, der skal klassificeres som UN GHS-kategori 1 (4). De identificerede begrænsninger, der anvendes til denne ICE-forsøgsmetode, er baseret på de høje falsk positiv-rater for alkoholer og de høje falsk negativ-rater for faste stoffer og overfladeaktive stoffer (1) (3) (9). Falske negativ-rater er imidlertid ikke afgørende i denne forbindelse (UN GHS-kategori 1 identificeret som ikke UN GHS-kategori 1), eftersom alle testkemikalier, der giver en $1 < \text{INIS} \leq 1$, efterfølgende vil blive testet med andre tilstrækkeligt validerede in vitro-test, alt efter de forskriftsmæssige krav, ved anvendelse af en sekventiel teststrategi med en "weight-of-the-evidence"-tilgang. Det bør bemærkes, at faste stoffer kan føre til varierende og ekstrem eksponering i in vivo-Draize-øjenirritationstesten, hvilket kan medføre irrelevante forudsigelser af deres sande irritationspotentiale (15). Undersøgeren kan overveje at anvende denne forsøgsmetode til alle typer af kemikalier, hvorved et positivt resultat bør accepteres som indikation på alvorlig øjenskade, dvs. UN GHS-kategori 1 uden yderligere test. Positive resultater for alkoholer bør dog fortolkes med forsigtighed som følge af risikoen for overfortolkning.

Ved identificering af kemikalier, der medfører alvorlig øjenskade (UN GHS-kategori 1), har ICE-forsøgsmetoden en generel nøjagtighed på 86 % (120/140), en falsk positiv-rate på 6 % (7/113) og en falsk negativ-rate på 48 % (13/27) i sammenligning med in vivo-kaninøjeforsøgsmetodedata klassificeret i henhold til UN GHS-klassificeringssystemet (4) (5).

ICE-forsøgsmetoden kan også anvendes til at identificere kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade i henhold til UN GHS-klassificeringssystemet (4). De relevante kompetente myndigheder bør høres, før ICE anvendes i en bottom-up-tilgang i henhold til andre klassifikationsordninger. Denne forsøgsmetode kan anvendes til alle typer af kemikalier, hvor der kan accepteres et negativt resultat, som ikke klassificerer et kemikalie for øjenirritation og alvorlig øjenskade. På grundlag af et resultat af valideringsdatabasen kan der forekomme underfortolkning af antifoulingmaling, der indeholder organiske opløsningsmidler (5).

Ved identificering af kemikalier, der ikke kræver klassificering for øjenirritation og alvorlig øjenskade, har ICE-forsøgsmetoden en generel nøjagtighed på 82 % (125/152), en falsk positiv-rate på 33 % (26/79) og en falsk negativ-rate på 1 % (1/73) sammenlignet med in vivo-kaninøjeforsøgsmetodedata klassificeret i henhold til UN GHS-klassificeringssystemet (4) (5). Når testkemikalier i visse klasser (dvs. antifoulingmaling, der indeholder organiske opløsningsmidler) udelukkes fra databasen, er nøjagtigheden af ICE-forsøgsmetoden 83 % (123/149), falsk positiv-raten 33 % (26/78) og falsk negativ-raten 0 % (0/71) for UN GHS-klassificeringssystemet (4) (5).

ICE-forsøgsmetoden anbefales ikke til identifikation af testkemikalier, der bør klassificeres som øjenirriterende (dvs. UN GHS-kategori 2 eller 2A) eller testkemikalier, der bør klassificeres som let øjenirriterende (UN GHS-kategori 2B), som følge af det store antal kemikalier i UN GHS-kategori 1, som underklassificeres som UN GHS-kategori 2, 2A eller 2B, og kemikalier, der ifølge UN GHS er uden for kategori, og som overklassificeres som UN GHS-kategori 2, 2A eller 2B. Til dette formål kan der være behov for at gennemføre yderligere test med en anden egnet metode.

Alle procedurer med kyllingeøjne bør følge testfacilitetens gældende forskrifter og procedurer for håndtering af humane eller animalske materialer, hvilket omfatter, men ikke er begrænset til, væv og vævsvæsker. Det anbefales at benytte universale laboratorieforsigtighedsregler (16).

Mens ICE-forsøgsmetoden ikke tager højde for conjunctiva- og irisskader som evalueret i kaninøjeforsøgsmetoden for irritation, behandler den corneavirkninger, som er den vigtigste faktor for klassificering in vivo i betragtning af UN GHS-klassificeringen. Desuden kan reversibiliteten af cornealæsioner ikke vurderes i sig selv med ICE-forsøgsmetoden, men det er på grundlag af kaninøjeundersøgelser foreslået, at en vurdering af den indledende cornealæsionsdybde kan anvendes til at identificere visse typer irreversible virkninger (17). Der er navnlig behov for yderligere videnskabelig viden for at forstå, hvordan irreversible virkninger, der ikke er forbundet med indledende stor skade, opstår. Endelig muliggør ICE-forsøgsmetoden ikke vurdering af den potentielle systemiske toksicitet i forbindelse med øjeneksponering.

Denne forsøgsmetode vil blive opdateret regelmæssigt, i takt med at nye oplysninger og data behandles. Histopatologi kan f.eks. være potentielt nyttig ved behov for en mere fuldstændig beskrivelse af skader på cornea. Ved evaluering af denne mulighed opfordres brugerne til at konservere øjnene og udarbejde histopatologiprøver, der kan bruges til at udvikle en database og beslutningskriterier, der kan forbedre nøjagtigheden af denne forsøgsmetode yderligere. OECD har udarbejdet en vejledning i brug af in vitro- øjentoksicitetsforsøgsmetoder, som omfatter detaljerede procedurer for indsamling af histopatologiprøver og oplysninger om, hvor man kan indsende prøver og/eller histopatologiske data (8).

Ethvert laboratorium bør, når det påbegynder brug af dette assay, benytte kompetencekemikalierne i tillæg 2. Et laboratorium kan benytte disse kemikalier til at godtgøre sin tekniske kompetence vedrørende brug af ICE-forsøgsmetoden, inden det påbegynder fremsendelse af ICE-data med henblik på forskriftsmæssig fareklassificering.

PRINCIP FOR TESTEN

ICE-forsøgsmetoden er en organotypisk model, som kortvarigt opretholder kyllingeøjets funktion in vitro. Ved denne forsøgsmetode vurderes testkemikalietts beskadigende virkning ved bestemmelse af corneaopsvulmning, -uklarhed og -fluoresceinretention. Mens de to sidstnævnte parametre indebærer en kvalitativ vurdering, medfører analyse af corneaopsvulmning, at der skal foretages en kvantitativ vurdering. Hver måling konverteres enten til en kvantitativ score, som anvendes til beregning af et samlet irritationsindeks (Irritation Index), eller tildeles en kvalitativ kategorisering, som anvendes til at tildele en in vitro-fareklassificering enten som UN GHS-kategori 1 eller som UN GHS uden for kategori. Disse resultater kan derefter anvendes til at forudsige potentiel alvorlig øjenskade in vivo eller fraværet af kravet om klassificering af risikoen for øjenskade for et testkemikalie (jf. Beslutningskriterier). Der kan imidlertid ikke gives nogen klassificering for kemikalier, som ikke forudsiges at medføre alvorlig øjenskade, eller som ikke er klassificeret med ICE-forsøgsmetoden (jf. punkt 11).

Kilde til kyllingeøjne og deres alder

Historisk set er der til dette assay anvendt øjne indsamlet fra kyllinger på et slagteri, hvor de aflives med henblik på anvendelse til konsum, hvilket eliminerer behovet for forsøgsdyr. Kun øjnene fra raske dyr, som anses for egnede til at indgå i menneskets fødekæde, anvendes.

Selv om der ikke er gennemført en kontrolleret undersøgelse til vurdering af den optimale kyllingealder, har de ved denne forsøgsmetode anvendte kyllinger historisk set haft samme alder og vægt som de på et fjerkræslagteri traditionelt behandlede våryllinger (dvs. ca. syv uger gamle kyllinger med en vægt på 1,5-2 kg).

Indsamling og transport af øjne til laboratoriet

Hovederne bør fjernes umiddelbart efter sedering af kyllingerne, som sædvanligvis sker ved elektrisk stød, og incision i halsen med henblik på afblødning. Der bør findes en lokal kilde til kyllinger tæt på laboratoriet, således at deres hoveder kan overføres fra slagteriet til laboratoriet hurtigt nok til, at ødelæggelse og/eller bakteriekontaminering minimeres. Tidsintervallet mellem indsamling af kyllingehovederne og placering af øjnene i superfusionsapparatets kammer efter enukleering bør minimeres (typisk inden for to timer) for at sikre, at assayets acceptkriterier overholdes. Alle de øjne, som anvendes i assayet, bør stamme fra samme gruppe øjne, som er indsamlet på en bestemt dag.

Eftersom øjnene fridissekres i laboratoriet, transporteres de intakte hoveder fra slagteriet ved omgivende temperatur (typisk mellem 18 °C og 25 °C) i plastkasser befugtet med klude, som er vædet med isotonisk saltvand.

Udvælgelseskriterier for og antal øjne, der anvendes i ICE-testen

Øjne med et højt niveau af basislinjefluoresceinfarvning (dvs. > 0,5) eller en høj cornea-uklarhedsscore (dvs. > 0,5) efter enukleering kasseres.

Hver behandlingsgruppe og en samtidig positiv kontrol består af mindst tre øjne. Den negative kontrolgruppe eller opløsningsmiddelkontrollen (hvis der anvendes et andet opløsningsmiddel end saltvand) består af mindst et øje.

I tilfælde af faste materialer, der resulterer i UN GHS uden for kategori, anbefales det at foretage endnu en test af tre øjne for at be- eller afkræfte det negative resultat.

FREM GANGSMÅDE

Præparering af øjnene

Øjenlågene bortskæres forsigtigt og uden at beskadige cornea. Der foretages en hurtig vurdering af cornea-integriteten ved at påføre en dråbe 2 % (vægt/volumen) natriumfluorescein på cornea-overfladen i nogle få sekunder, hvorefter der skylles med isotonisk saltvand. De fluoresceinbehandlede øjne undersøges derefter med et spaltelampemikroskop for at sikre, at cornea er ubeskadiget (dvs. har scorer for fluoresceinretention og cornea-uklarhed $\leq 0,5$).

Er cornea ubeskadiget, fridissekres øjet helt fra kraniet uden at beskadige cornea. Øjeæblet trækkes ud af øjenhulen ved et fast tag i blinkhinden med en kirurgisk tang, og øjenmusklerne skæres over med en bøjet, stumpend saks. Det er vigtigt at undgå skader på cornea som følge af overdrevent tryk (dvs. komprimeringsartefakter).

Når øjet fjernes fra øjenhulen, skal der medfølge en synlig vedhængende del af synsnerven. Efter fjernelsen fra øjenhulen anbringes øjet på et absorberende underlag, hvorefter blinkhinden og andet bindevæv skæres væk.

Det enukleerede øje anbringes i en rustfri stålholder med cornea i lodret position. Derefter indsættes holderen i et kammer i superfusionsapparatet (18). Holderne bør anbringes sådan i superfusionsapparatet, at det isotoniske saltvand drypper ned over hele cornea (3-4 dråber pr. minut eller 0,1 til 0,15 ml/min). Temperaturen i superfusionsapparatets kamre bør være reguleret til $32 \pm 1,5$ °C. Tillæg 3 indeholder et diagram over et typisk superfusionsapparat og øjenholderne, som kan købes i handelen eller konstrueres. Apparatet kan modificeres, så det opfylder det enkelte laboratoriums behov (f.eks. så det kan rumme et andet antal øjne).

Efter anbringelsen i superfusionsapparatet undersøges øjnene igen med et spaltelampemikroskop for at sikre, at de ikke er blevet beskadiget under dissektionsproceduren. På dette tidspunkt måles også corneatykkelsen. Den måles ved corneas toppunkt ved anvendelse af dybdemålingsanordningen på spaltelampemikroskopet. Øjne med i) en fluoresceinretentionsscore på > 0,5, ii) en cornea-uklarhed på > 0,5 eller iii) eventuelle andre tegn på beskadigelse bør udskiftes. Af de øjne, der ikke kasseres ud fra nogen af ovennævnte kriterier, kasseres øjne med en corneatykkelse, som afviger mere end 10 % fra gennemsnitsværdien for alle øjne. Brugere skal være opmærksomme på, at spaltelampemikroskoper kan give forskellige corneatykkelsesmålinger alt efter indstillingen af spaltebredden. Spaltebredden bør indstilles til 0,095 mm.

Når alle øjnene er undersøgt og godkendt, inkuberes de i ca. 45 til 60 minutter for at bringe dem i ligevægt med testsystemet inden dosering. Efter ligevægtsindstillingsperioden foretages en nulpunktsreferencemåling af corneatykkelse og -uklarhed, der skal fungere som basislinje (dvs. tid = 0). Den ved fridissekering bestemte fluoresceinscore anvendes som basislinjemåling for det endepunkt.

Påføring af testkemikaliet

Umiddelbart efter nulpunktsreferencemålingerne fjernes øjet (i sin holder) fra superfusionsapparatet og anbringes i vandret position, hvorefter testkemikaliet påføres på cornea.

Flydende testkemikalier testes typisk ufortyndede, men kan fortyndes, hvis det anses for nødvendigt (f.eks. som del af undersøgelsens design). Det foretrukne opløsningsmiddel til fortyndede testkemikalier er fysiologisk saltvand. Der kan imidlertid også anvendes alternative opløsningsmidler under kontrollerede betingelser, men egnetheden af andre opløsningsmidler end fysiologisk saltvand bør påvises.

Flydende testkemikalier påføres på cornea således, at hele overfladen af cornea dækkes jævnt med testkemikaliet. Standardvolumenet er 0,03 ml.

Om muligt bør faste testkemikalier formales så fint som muligt med morter og støder eller et tilsvarende formalingsværktøj. Pulveret påføres på cornea således, at overfladen dækkes jævnt med testkemikaliet. Standardmængden er 0,03 g.

Når testkemikaliet (flydende eller fast) har været påført i 10 sekunder, skylles det væk fra øjet med isotonisk saltvand (ca. 20 ml) ved omgivende temperatur. Øjet (i sin holder) sættes derefter tilbage i superfusionsapparatet i sin oprindelige opretstående position. Hvis der er behov for yderligere skylning, kan dette ske 10 sekunder efter påførelsen og på efterfølgende tidspunkter (f.eks. ved fund af rester af testkemikaliet på cornea). Generelt er det ikke afgørende, hvilken mængde saltvand der bruges til yderligere skylning, men det er vigtigt at observere, om kemikaliet klæber fast til cornea.

Kontrolkemikalier

Der bør indgå samtidige negative kontroller eller opløsningsmiddel/bærestof-kontroller og positive kontroller i hvert forsøg.

Ved test af væsker i en koncentration på 100 % eller faste stoffer anvendes fysiologisk saltvand som den samtidige negative kontrol ved ICE-forsøgsmetoden, således at ikke-specifikke ændringer i testsystemet kan påvises, og det kan sikres, at assaybetingelserne ikke fejlagtigt resulterer i en irritationsrespons.

Ved test af fortyndede væsker medtages en samtidig opløsningsmiddel/bærestof-kontrolgruppe ved forsøgsmetoden, således at ikke-specifikke ændringer i testsystemet kan påvises, og det kan sikres, at assaybetingelserne ikke fejlagtigt resulterer i en irritationsrespons. Som anført i punkt 31 kan der kun anvendes et opløsningsmiddel/bærestof, som påviseligt ikke påvirker testsystemet negativt.

Der medtages et kendt øjenirriterende stof som samtidig positiv kontrol i hvert forsøg for at verificere, at der induceres en passende respons. Eftersom ICE-assayet anvendes i denne forsøgsmetode til identifikation af ætsende eller stærkt irriterende stoffer, bør den positive kontrol være et referencekemikalie, som inducerer en svær respons ved denne forsøgsmetode. For at sikre at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør den svære respons imidlertid ikke være overdrevent stor. Der bør genereres tilstrækkelige in vitro-data for den positive kontrol, således at der kan beregnes et statistisk defineret acceptabelt interval for den positive kontrol. Hvis der ikke er tilstrækkelige historiske ICE-forsøgsmetodedata tilgængelige for en bestemt positiv kontrol, kan det være nødvendigt at gennemføre undersøgelser for at tilvejebringe disse oplysninger.

Eksempler på positive kontroller for flydende testkemikalier er 10 % eddikesyre eller 5 % benzalkoniumchlorid, mens eksempler på positive kontroller for faste testkemikalier er natriumhydroxid eller imidazol.

Referencekemikalier er nyttige i forbindelse med vurdering af øjenirritationspotentialer for ukendte kemikalier i en særlig kemikalie- eller produktgruppe eller vurdering af det relative irritationspotentialer for et øjenirriterende stof inden for et specifikt område af irritationsresponsen.

Målte endepunkter

Behandlede corneae vurderes inden behandlingen og ved 30, 75, 120, 180 og 240 minutter (± 5 minutter) efter skylningen efter behandlingen. Med disse tidspunkter opnås et passende antal målinger over behandlingsperioden på fire timer, samtidig med at der er tilstrækkelig tid mellem målingerne til at foretage de fornødne observationer for alle øjnene.

De vurderede endepunkter er cornea-uklarhed, -opsvulmning og -fluoresceinretention samt morfologiske virkninger på cornea (f.eks. erosion eller løsning af epitelet). Alle endepunkterne med undtagelse af fluoresceinretention (som kun bestemmes inden behandlingen og 30 minutter efter eksponering med testkemikaliet) bestemmes på hvert af de ovennævnte tidspunkter.

Det tilrådes at tage fotografier for at dokumentere cornea-uklarhed og -fluoresceinretention, morfologiske virkninger på cornea og, hvis det udføres, histopatologi.

Efter den afsluttende undersøgelse efter fire timer opfordres brugerne til at konservere øjnene i et egnet fikseringsmiddel (f.eks. neutralbufret formalin) med henblik på eventuel histopatologisk undersøgelse (jf. punkt 14 og henvisning (8) for nærmere oplysninger).

Cornea-opsvulmning bestemmes ud fra corneatykkelsesmålinger foretaget med et optisk pachymeter på et spaltelampemikroskop. Den udtrykkes i procent og beregnes ud fra corneatykkelsesmålinger ved hjælp af følgende formel:

$$\left(\frac{\text{corneatykkelse ved tidspunkt } t - \text{corneatykkelse ved tidspunkt } = 0}{\text{corneatykkelse ved tidspunkt } = 0} \right) \times 100$$

Den gennemsnitlige procentvise cornea-opsvulmning for alle testøjnene beregnes for alle observationstidspunkter. Ud fra den højeste gennemsnitsscore for cornea-opsvulmning som observeret på et hvilket som helst af tidspunkterne opnås der derefter en samlet kategoriscore for hvert testkemikalie (jf. punkt 51).

Vurderingen af cornea-uklarhed baseres på scoring af det område af cornea, hvor uklarheden er mest udtalt som vist i tabel 1. Den gennemsnitlige værdi for cornea-uklarhed for alle testøjnene beregnes for alle observationstidspunkter. Ud fra den højeste gennemsnitsscore for cornea-uklarhed som observeret på et hvilket som helst af tidspunkterne opnås der derefter en samlet kategoriscore for hvert testkemikalie (jf. punkt 51).

Tabel 1

Score for cornea-uklarhed

Score	Observation
0	Ingen uklarhed
0,5	Meget ubetydelig uklarhed
1	Spredte eller diffuse områder; detaljer i iris ses tydeligt
2	Let skelneligt gennemskinneligt område; detaljer i iris er en anelse utydelige
3	Stærk cornea-uklarhed; ingen specifikke detaljer i iris er synlige; pupillens størrelse kan kun lige akkurat skelnes
4	Fuldstændig cornea-uklarhed; iris usynlig

Fluoresceinretention vurderes kun ved 30-minutters observationstidspunktet som vist i tabel 2. Den gennemsnitlige fluoresceinretentionsværdi for alle testøjnene beregnes herefter for 30-minutters observationstidspunktet og bruges til at opnå den samlede kategoriscore for hvert testkemikalie (jf. punkt 51).

Tabel 2

Score for fluoresceinretention

Score	Observation
0	Ingen fluoresceinretention
0,5	Meget ubetydelig enkeltcellefærvning
1	Enkeltcellefærvning spredt ud over hele det behandlede område af cornea
2	Fokal eller sammenflydende enkeltcellefærvning med høj tæthed
3	Fluorescein er tilbageholdt i store sammenflydende områder af cornea

Morfologiske virkninger omfatter "erosion" af cornea-epitelceller, "løsning" af epitelet, "tiltagende ruhed" af cornea-overfladen og "fastklæben" af testkemikaliets til cornea. Disse resultater kan have varierende sværhedsgrad og kan forekomme samtidig. Klassificeringen af disse resultater er subjektiv og baseret på undersøgerens fortolkning.

DATA OG RAPPORTERING

Datavurdering

Resultaterne for cornea-uklarhed, -opsvulmning og -fluoresceinretention bør vurderes særskilt for at finde frem til en ICE-stofgruppe for hvert endepunkt. Derefter kombineres ICE-stofgrupperne for hvert endepunkt for at opnå en irritationsklassificering (Irritancy Classification) for hvert testkemikalie.

Beslutningskriterier

Når hvert af endepunkterne er vurderet, kan der fastlægges ICE-stofgrupper på grundlag af forudfastsatte intervaller. Fortolkning af cornea-opsvulmning (tabel 3), -uklarhed (tabel 4) og -fluoresceinretention (tabel 5) ved anvendelse af fire ICE-stofgrupper udføres ud fra nedenstående skalaer: Det er vigtigt at bemærke, at scorerne for cornea-opsvulmning, der vises i tabel 3, kun er relevante, hvis tykkelsen måles med et spaltelampemikroskop (f.eks. Haag-Streit BP900) med dybdemålingsanordning nr. 1 og med spaltebredden indstillet til 9 ½, svarende til 0,095 mm. Brugerne skal være opmærksomme på, at spaltelampemikroskoper kan give forskellige corneatykkelsesmålinger alt efter indstillingen af spaltebredden.

Tabel 3

ICE-klassificeringskriterier for cornea-opsvulmning

Gennemsnitlig cornea-opsvulmning (%) (*)	ICE-stofgruppe
0-5	I
> 5-12	II

Gennemsnitlig cornea-opsvulmning (%) (*)	ICE-stofgruppe
> 12-18 (> 75 min. efter behandling)	II
> 12-18 ($\leq$ 75 min. efter behandling)	III
18-26	III
> 26-32 (> 75 min. efter behandling)	III
> 26-32 ($\leq$ 75 min. efter behandling)	IV
> 32	IV

(*) Højeste observerede gennemsnitsscore på et hvilket som helst tidspunkt

Tabel 4

ICE-klassificeringskriterier for uklarhed

Maksimal gennemsnitlig uklarhedsscore (*)	ICE-stofgruppe
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Maksimal gennemsnitlig score observeret på et hvilket som helst tidspunkt (baseret på uklarhedsscorer som defineret i tabel 1).

Tabel 5

ICE-klassificeringskriterier for gennemsnitlig fluoresceinretention

Gennemsnitlig fluoresceinretentionsscore 30 minutter efter behandling (*)	ICE-stofgruppe
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Baseret på scorer som defineret i tabel 2.

In vitro-klassificeringen for et testkemikalie fastsættes ved at aflæse den GHS-klassificering, der svarer til kombinationen af kategorier opnået for cornea-opsvulmning, -uklarhed og -fluoresceinretention som beskrevet i tabel 6.

Tabel 6

Overordnede in vitro-klassificeringer

UN GHS-klassificering	Kombinationer af de tre endepunkter
Uden for kategori	3 × I 2 × I, 1 × II
Ingen forudsigelse mulig	Andre kombinationer
Kategori 1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Cornea-uklarhed ≥ 3 efter 30 min. (for mindst to øjne) Cornea-uklarhed = 4 på et hvilket som helst tidspunkt (for mindst to øjne) Markant løsning af epitelet (for mindst et øje)

(*) Disse kombinationer er mindre sandsynlige.

Undersøgelsesacceptkriterier

En test anses for acceptabel, hvis de samtidige negative kontroller eller opløsningsmiddel-/bærestofkontroller og de samtidige positive kontroller er identificeret som henholdsvis GHS uden for kategori og GHS-kategori 1.

Testrapport

Testrapporten bør omfatte følgende oplysninger, hvis de er relevante for undersøgelsens gennemførelse:

Testkemikalie og kontrolkemikalier

- kemisk(e) navn(e) såsom det strukturnavn, der anvendes af Chemical Abstracts Service (CAS), efterfulgt af andre navne, hvis sådanne kendes
- CAS-registreringsnummeret (RN), hvis det kendes
- renhed og sammensætning af test-/kontrolkemikalier (i vægtprocent) i det omfang, disse oplysninger er tilgængelige
- fysisk-kemiske egenskaber, såsom fysisk tilstand, flygtighed, pH, stabilitet, kemikaliegruppe og vandopløselighed, som er relevante for undersøgelsens gennemførelse
- eventuel behandling af test-/kontrolkemikalier inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)
- stabilitet, hvis den kendes.

Oplysninger om sponsor og testfacilitet

- navn og adresse på sponsoren, testfaciliteten og undersøgelseslederen
- identifikation af kilden til øjnene (f.eks. den facilitet, hvor de er indsamlet).

Betingelser for forsøgsmetoden

- beskrivelse af det anvendte testsystem

- det anvendte spaltelampemikroskop (f.eks. model) og instrumentindstillinger for det anvendte spaltelampemikroskop
- reference til historiske negative og positive kontrolresultater og, hvis det er relevant, historiske data, der viser acceptable samtidige referencekontrolintervaller
- procedure, som anvendes til at sikre integriteten (dvs. nøjagtighed og pålidelighed) af forsøgsmetoden over tid (f.eks. periodisk test af kompetencekemikalier).

Indsamling og præparering af øjne

- donordyrenes alder og vægt og, hvis de er tilgængelige, andre særlige karakteristika ved de dyr, som øjnene er indsamlet fra (f.eks. køn, stamme)
- opbevarings- og transportbetingelser for øjnene (f.eks. dato og klokkeslæt for øjenindsamling, tidsinterval mellem indsamling af kyllingehovederne og anbringelse af enukleerede øjne i superfusionsapparatets kammer)
- præparering og montering af øjne, herunder specifikation af deres kvalitet, øjenkamrenes temperatur og kriterierne for udvælgelse af øjne, der anvendes til test.

Testprocedure

- antal benyttede replikater
- identiteten af de anvendte positive og negative kontroller (hvor dette er relevant også opløsningsmiddel- og benchmarkkontroller)
- dosis af testkemikalie, indgivelse og eksponeringstid
- observationstidspunkter (før og efter behandling)
- beskrivelse af de anvendte vurderings- og beslutningskriterier
- beskrivelse af de benyttede undersøgelsesacceptkriterier
- beskrivelse af eventuelle ændringer i testproceduren.

Resultater

- opstilling i tabelform af de opnåede scorer for cornea-opsvulmning, -uklarhed og fluoresceinretention for hvert enkelt øje og på hvert observationstidspunkt, herunder den gennemsnitlige score for hvert observationstidspunkt for alle undersøgte øjne
- de højeste gennemsnitlige scorer for konstateret cornea-opsvulmning, -uklarhed og fluoresceinretention (fra et hvilket som helst tidspunkt) og den tilhørende ICE-klasse.
- Beskrivelse af eventuelle andre observationer
- den afledte in vitro GHS-klassificering
- fotografier af øjnene, hvis det er relevant.

Diskussion af resultaterne

Konklusion

LITTERATUR

- (1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report — *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Tilgængelig på: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]
- (2) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Tilgængelig på: [<http://ecvam.jrc.it/index.htm>].

- (3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Status of *in vitro* Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Tilgængelig på: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>]
 - (4) United Nations (UN) (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York & Geneva, 2011. Tilgængelig på: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html].
 - (5) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment no. 188 (Part 1 and Part 2), OECD, Paris.
 - (6) Kapitel B.5 i dette bilag, Akut øjenirritation/-ætsning.
 - (7) Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, 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. *Toxicology In Vitro* 24, 1-9.
 - (8) OECD (2011) Guidance Document on “The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants”. Series on Testing and Assessment, No.160, OECD, Paris.
 - (9) ICCVAM. (2006). Dokument til baggrundsrevision: Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Tilgængelig på: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]
 - (10) Prinsen, M. K. og Koëter, B. W. M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.
 - (11) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13pp. Tilgængelig på: [<http://ecvam-dbal.m.jrc.ec.europa.eu/>].
 - (12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.
 - (13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.* 34:291-296.
 - (14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.
 - (15) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicology in Vitro* 20,78-81.
 - (16) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Tilgængelig på: [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>].
 - (17) Maurer, J.K., Parker, R.D. and 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.
 - (18) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.-Toxicol.* 19, 471-480.
-

Tillæg 1

DEFINITIONER

Nøjagtighed: Overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af »relevans«. Udtrykket benyttes ofte som synonym for »konkordans«, forstået som den andel af korrekte udfald, forsøgsmetoden fører til.

Benchmarkkemikalie: Et kemikalie, der anvendes som standard til sammenligning med et testkemikalie. Et benchmarkkemikalie bør have følgende egenskaber: i) en eller flere ensartede og pålidelige kilder, ii) strukturel og funktionel lighed med den klasse af kemikalier, der testes, iii) kendte fysisk-kemiske egenskaber, iv) støtdata om kendte virkninger og v) kendt styrke i det ønskede responsområde

Bottom-up-tilgang: Trinvis tilgang til et kemikalie mistænkt for ikke at kræve klassificering for øjenirritation eller alvorlig øjenskade, der starter med bestemmelse af kemikalier, som ikke kræver klassifikation (negativt resultat) fra andre kemikalier (positivt resultat).

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

Cornea: Den transparente del af øjæblets forside, som dækker øjets iris og pupil, og hvorigennem lys kommer ind i øjets indre.

Cornea-uklarhed: Måling af graden af cornea-uigennemsigtighed efter eksponering for et testkemikalie. Øget cornea-uklarhed er indikativt for beskadigelse af cornea.

Cornea-opsvulmning: Objektiv måling i ICE-testen af graden af cornea-udvidelse efter eksponering for et testkemikalie. Den udtrykkes som en procentdel og beregnes ud fra basismålinger af cornea-tykkelsen (inden dosis) og tykkelsen, der registreres med regelmæssige intervaller efter eksponering for testkemikallet i ICE-testen. Graden af cornea-opsvulmning er indikativ for beskadigelse af cornea.

Øjenirritation: Frembringelse af forandringer i øjet, som opstår efter påføring af testkemikallet på øjets anteriore overflade, og som er fuldt reversibel inden for 21 dage efter påføring. Udskiftelige med »Reversible virkninger på øjet« og »UN GHS-kategori 2« (4).

Falsk negativ-rate: Den andel af alle positive kemikalier, som ved en forsøgsmetode fejlagtigt identificeres som negative. Dette er en indikator for forsøgsmetodens ydeevne.

Falsk positiv-rate: Den andel af alle negative kemikalier, som ved en forsøgsmetode fejlagtigt identificeres som positive. Dette er en indikator for forsøgsmetodens ydeevne.

Fluoresceinretention: Subjektiv måling i ICE-testen af det omfang, hvori natriumfluorescein tilbageholdes af epitelceller i cornea efter eksponering for et teststof. Graden af fluoresceinretention er indikativ for beskadigelse af cornea-epitelet.

Fare: Den iboende egenskab ved et middel eller en situation, som kan forårsage skade, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende middel.

Irreversible virkninger på øjet: se »Alvorlig øjenskade« og »UN GHS-kategori 1«.

Blanding: En blanding eller opløsning, der er sammensat af to eller flere stoffer, hvori de ikke reagerer (4).

Negativ kontrol: Et ubehandlet replikat, som indeholder alle komponenter fra et testsystem. Prøven behandles sammen med prøver behandlet med testkemikallet og andre kontrolprøver for at afgøre, hvorvidt opløsningsmidlet interagerer med testsystemet.

Ikke klassificeret: Stoffer, der ikke er klassificeret som øjenirriterende (UN GHS-kategori 2) eller som forårsagende alvorlig øjenskade (UN GHS-kategori 1). Udskiftelige med »UN GHS uden for kategori«.

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

Pålidelighed: Mål for, i hvilken grad en forsøgsmetode kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og repeterbarhed inden for laboratorier.

Reversible virkninger på øjet: se »Øjenirritation« og »UN GHS-kategori 2«.

Alvorlig øjenskade: Frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsettelse, som opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter påføring. Udskiftelige med »Irreversible virkninger på øjet« og »UN GHS-kategori 1« (4).

Spaltelampemikroskop: Instrument, som anvendes til direkte undersøgelse af øjet under forstørrelse tilvejebragt af et binokulært mikroskop ved frembringelse af et stereoskopisk, retvendt billede. Ved ICE-forsøgsmetoden anvendes dette instrument til at se kyllingeøjets anteriore strukturer samt til at foretage objektive målinger af corneas tykkelse ved at påmontere en anordning til dybdemåling.

Opløsningsmiddel-/bærestofkontrol: Ubehandlet prøve, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem, herunder opløsningsmidlet eller bærestoffet, og som behandles sammen med de testkemikaliebehandlede prøver og andre kontrolprøver for at fastlægge basisresponsen for de prøver, som er behandlet med testkemikaliets opløst i det samme opløsningsmiddel eller bærestof. Når denne prøve testes med en samtidig negativ kontrol, viser den også, hvorvidt opløsningsmidlet eller bærestoffet interagerer med testsystemet.

Stof: Grundstoffer og forbindelser heraf, naturlige eller industrielt fremstillede, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, som kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning (4).

Overfladeaktivt stof (surfactant): Også kaldet overfladeaktivt stof. Et stof, f.eks. et vaske- og rengøringsmiddel, der kan reducere overfladespændingen i en væske og dermed give den mulighed for at skumme eller trænge gennem faste stoffer. Kaldes også for befugtningsmiddel.

Top-down-tilgang: Trinvis tilgang, der anvendes for et kemikalie, som mistænkes for at forårsage alvorlig øjenskade, der starter med bestemmelse af kemikalier, som forårsager alvorlig øjenskade (positivt resultat), i forhold til andre kemikalier (negativt resultat).

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

Trindelt teststrategi: Ved anvendelse af den trinvis teststrategi gennemgås alle eksisterende oplysninger om et testkemikalie i en bestemt rækkefølge ved anvendelse af en weight-of-the-evidence-proces på hvert trin for at fastslå, om der foreligger tilstrækkelige oplysninger til at træffe en fareklassificeringsafgørelse, inden der fortsættes til næste trin. Hvis et testkemikalies irritationspotentiale kan underbygges baseret på eksisterende oplysninger, er der ikke behov for at foretage yderligere test. Hvis et testkemikalies irritationspotentiale ikke kan underbygges baseret på eksisterende oplysninger, foretages en trindelt sekventiel dyreforsøgsprocedure, indtil der kan foretages en utvetydig klassificering.

De Forenede Nationers globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals — UN GHS): Et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, risikosætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersoner) og miljø (4).

UN GHS-kategori 1: se »Alvorlig øjenskade« og/eller »Irreversible virkninger på øjet«.

UN GHS-kategori 2: se »Øjenirritation« og/eller »Reversible virkninger på øjet«.

UN GHS uden for kategori: Stoffer, der ikke opfylder kravene med hensyn til klassificering som UN GHS-kategori 1 eller 2 (2A eller 2B). Udsiftelig med »Ikke-klassificeret«.

Valideret forsøgsmetode: En forsøgsmetode, for hvilken der er gennemført valideringsundersøgelser for at fastslå relevansen (herunder nøjagtigheden) og pålideligheden til et bestemt formål. Det er vigtigt at være opmærksom på, at en valideret forsøgsmetode måske ikke har tilstrækkelig ydeevne med hensyn til nøjagtighed og pålidelighed til at være acceptabel til det planlagte formål.

»Weight-of-the-evidence«: Proces, hvor styrkerne og svaghederne ved forskellige oplysninger afvejes for at nå frem til og underbygge en konklusion om et stofs farepotentiale.

Tillæg 2

KOMPETENCEKEMIKALIER TIL ICE-FORSØGSMETODEN

Inden laboratorier påbegynder rutinemæssig brug af en forsøgsmetode, der følger denne forsøgsmetode, bør de godtgøre deres tekniske kompetence ved korrekt identifikation af øjenrisikoklassificeringen for de 13 anbefalede kemikalier i tabel 1. Disse kemikalier er udvalgt således, at de repræsenterer responsområdet for øjenrisiko, der er baseret på resultater fra in vivo-kaninøjentesten (TG 405) og FN's GHS-klassificeringssystem (dvs. UN GHS-kategori 1, 2A, 2B eller uden for kategori) (4) (6). Andre udvælgelseskriterier var, at kemikalierne er kommercielt tilgængelige, at der findes tilgængelige in vivo-referencedata af høj kvalitet, og at der findes data af høj kvalitet for ICE in vitro-metoden. Referencedata findes i SSD (5) og i ICCVAM Background Review Documents for ICEBCOP-forsøgsmetoden og for isoleret kyllingeøje-forsøgsmetoden (ICE [Isolated Chicken Eye]-forsøgsmetoden) (9).

Tabel 1

Anbefalede kemikalier til godtgørelse af teknisk kompetence i anvendelse af ICE

Kemikalie	CASRN	Kemikaliegruppe ⁽¹⁾	Fysisk form	In vivo-klassificering ⁽²⁾	In vitro-klassificering ⁽³⁾
Benzalkoniumchlorid (5 %)	8001-54-5	Oniumforbindelse	Flydende	Kategori 1	Kategori 1
Chlorhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Fast	Kategori 1	Kategori 1
Dibenzoyl-L-vinsyre	2743-38-6	Carboxylsyre, ester	Fast	Kategori 1	Kategori 1
Imidazol	288-32-4	Heterocyklisk	Fast	Kategori 1	Kategori 1
Trichloreddikesyre (30 %)	76-03-9	Carboxylsyre	Flydende	Kategori 1	Kategori 1
2,6-dichlor-benzoyl-chlorid	4659-45-4	Acylhalogenid	Flydende	Kategori 2A	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser ⁽⁴⁾
Ammoniumnitrat	6484-52-2	Uorganisk salt	Fast	Kategori 2A ⁽⁵⁾	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser ⁽⁴⁾
Ethyl-2-methylacetat	609-14-3	Keton, ester	Flydende	Kategori 2B	Der kan ikke fremsættes nogen forudsigelser ⁽⁴⁾
Dimethylsulfoxid	67-68-5	Uorganisk svovlforbindelse	Flydende	Uden for kategori	Uden for kategori
Glycerol	56-81-5	Alkohol	Flydende	Uden for kategori	Uden for kategori (grænsetilfælde)

Kemikalie	CASRN	Kemikaliegruppe ⁽¹⁾	Fysisk form	In vivo-klassificering ⁽²⁾	In vitro-klassificering ⁽³⁾
Methylcyclopentan	96-37-7	Carbonhydrid (cyklisk)	Flydende	Uden for kategori	Uden for kategori
n-hexan	110-54-3	Carbonhydrid (acyklisk)	Flydende	Uden for kategori	Uden for kategori
Triacetin	102-76-1	Lipid	Flydende	Ikke klassificeret	Uden for kategori

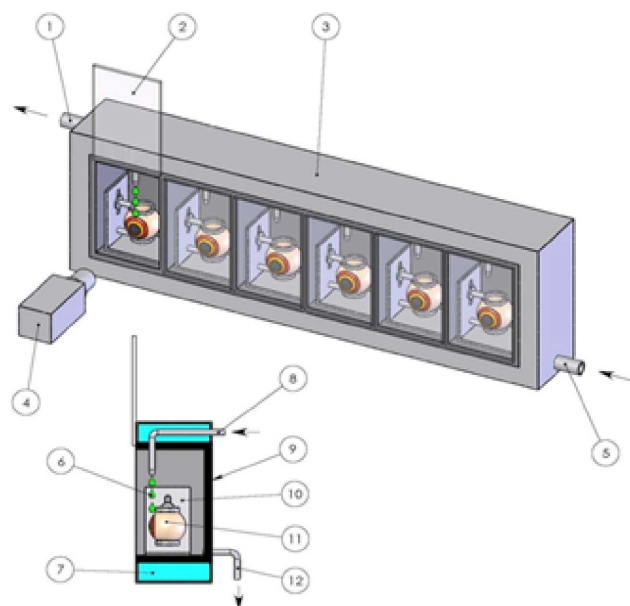
Forkortelser: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number

- ⁽¹⁾ Kemikaliegrupperne for hvert testkemikalie blev fastsat ved anvendelse af et standardklassificeringsskema baseret på National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH)-klassificeringssystemet (se følgende websted: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>)
- ⁽²⁾ Baseret på resultater fra in vivo-kaninøjentesten (OECD TG 405) og brug af UN GHS (4) (6).
- ⁽³⁾ Baseret på resultater fra ICE som beskrevet i tabel 6.
- ⁽⁴⁾ Kombination af andre ICE-scoringer end dem, der er beskrevet i tabel 6 for identifikation af GHS uden for kategori og GHS-kategori 1 (se tabel 6)
- ⁽⁵⁾ Klassificering som 2A eller 2B afhænger af fortolkningen af UN GHS-kriteriet for at skelne mellem disse to kategorier, dvs. 1 ud af 3 mod 2 ud af 3 dyr med virkninger på dag 7 er nødvendige for at opnå en kategori 2A-klassifikation. In vivo-undersøgelsen omfattede tre dyr. Alle endepunkter bortset fra conjunctiva-rødme hos et dyr, der opnåede en bedring til en score på nul på dag 7 eller tidligere. Den ene dyr, som var kommet sig fuldstændig på dag 7, havde en score for conjunctiva-rødme på 1 (på dag 7), med fuld bedring på dag 10.

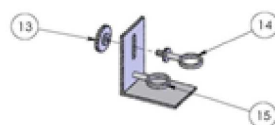
Tillæg 3

DIAGRAMMER OVER ICE-SUPERFUSIONSAPPARATET OG ØJENHOLDERNE

(Se Burton et al. (18) for yderligere generiske beskrivelser af superfusionsapparatet og øjenholderen)



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Punkt nr.	Beskrivelse	Punkt nr.	Beskrivelse
1	Udtag til varmt vand	9	Kammer
2	Skydedør	10	Øjenholder
3	Superfusionsapparat	11	Kyllingeøje
4	Optisk måleinstrument	12	Udtag til saltopløsning
5	Tilførsel af varmt vand	13	Stilleskrue
6	Saltopløsning	14	Justerbar øvre arm
7	Varmt vand	15	Fast nedre arm«
8	Tilførsel af saltopløsning		

14) Del B, kapitel B.49, affattes således:

»B. 49 *In vitro*-mikrokernetest i pattedyrceller

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline) 487 (2016). Den er en del af en række forsøgsmetoder vedrørende genetisk toksikologi. Der er udarbejdet et OECD-dokument med kortfattede oplysninger om test af genetisk toksikologi og en oversigt over de nylige ændringer af denne testvejledning (1).

En *in vitro*-mikrokernetest (MNvit-test) er en genotoksicitetstest til påvisning af mikrokerner (MN) i cytoplasma i interfaseceller. Mikrokerner kan dannes ud fra acentriske kromosomfragmenter (dvs. uden en centromer), eller hele kromosomer, som ikke kan migrere til polerne under celledelingens anafase. Derfor er en MNvit-test en *in vitro*-metode, der danner et solidt grundlag for *in vitro*-undersøgelse af potentialet for kromosomskader, da både aneugener og klastogener kan påvises (2) (3) i celler, der har delt sig under eller efter eksponering for testkemikaliets (se punkt 13 for yderligere oplysninger). Mikrokerner er skader, der er blevet overført til datterceller, hvorimod kromosomaberrationer, der er scoret i metafaseceller, ikke nødvendigvis er overført. I begge tilfælde overlever cellerne muligvis ikke disse ændringer.

I denne forsøgsmetode kan der anvendes protokoller med og uden aktinpolymeriseringsinhibitoren cytochalasin B (cytoB). Tilsætning af cytoB inden mitosen giver celler, der er binukleære, og giver derfor mulighed for identifikation og analyse af mikrokerner kun i de celler, der har afsluttet en mitose (4) (5). I denne forsøgsmetode kan der desuden anvendes protokoller uden cytokinesblokerende stof, hvis det kan dokumenteres, at den analyserede cellepopulation har undergået mitose.

Ud over anvendelse af MNvit-testen til identifikation af kemikalier, der inducerer mikrokerner, kan anvendelsen af immunkemisk mærkning af kinetokorer eller hybridisering med centromeriske/telomeriske prober (fluorescerende *in situ*-hybridisering (FISH)) tilvejebringe yderligere oplysninger om mekanismerne ved kromosomskade og mikrokernedannelse (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Disse mærknings- og hybridiseringsprocedurer kan anvendes i tilfælde af øget mikrokernedannelse, hvis forsøgslederen ønsker at bestemme, hvorvidt forøgelsen skyldtes klastogene og/eller aneugene hændelser.

Da mikrokerner i interfaseceller kan vurderes forholdsvis objektivt, behøver laboratoriepersonalet kun bestemme antallet af binukleære celler ved anvendelse af cytoB og hyppigheden af mikronukleære celler i alle tilfælde. Objektglassene kan derfor scores relativt hurtigt, og analysen kan automatiseres. Det gør det praktisk at score tusindvis i stedet for hundredvis af celler pr. behandling, hvilket øger testens power. Da mikrokerner kan dannes ud fra tiloversblevne kromosomer, er det endelig muligt at påvise aneuploidiinducerende stoffer, som er vanskelige at undersøge i konventionelle test for kromosomaberrationer, f.eks. kapitel B.10 i dette bilag (18). MNvit-testen, som beskrives i denne forsøgsmetode, giver dog ikke mulighed for at differentiere kemikalier, der forårsager ændringer i kromosomtal, og/eller ploidinducerende kemikalier fra klastogenicitetinducerende kemikalier uden særlige teknikker såsom FISH, der er beskrevet i punkt 4.

MNvit-testen er solid, kan udføres på en lang række celletyper og kan anvendes til påvisning af forekomst eller fravær af cytoB. Der findes omfattende data til støtte for gyldigheden af MNvit-testen med forskellige celletyper (kulturer af cellelinjer eller primære cellekulturer) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Det gælder bl.a. internationale valideringsundersøgelser, der koordineres af Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (19) (20) (21) (22) (23), og de rapporter, som er udarbejdet af International Workshop on Genotoxicity Testing (5) (17). De tilgængelige data er desuden blevet revurderet i forbindelse med en retrospektiv weight-of-evidence-undersøgelse gennemført af Det Europæiske Center for Validering af Alternative Metoder (ECVAM) under Europa-Kommissionen, og ECVAM's videnskabelige rådgivende udvalg (ESAC) har godkendt forsøgsmetoden som videnskabeligt underbygget (37) (38) (39).

I MNvit-testen af pattedyrceller kan der benyttes kulturer af cellelinjer eller primære cellekulturer af human oprindelse eller gnaveroprindelse. Da baggrundsforekomsten af mikrokerner vil påvirke testens følsomhed, anbefales det, at der anvendes celletyper med en stabil og fastlagt baggrundsforekomst af mikrokernedannelse. Cellerne udvælges på grundlag af deres evne til at vokse godt ved dyrkning, karotypens stabilitet (herunder kromosomtal) og hyppigheden af spontane mikrokerner (40). På nuværende tidspunkt gør de tilgængelige data det ikke muligt at fremsætte konkrete anbefalinger, men viser, at det i forbindelse med vurdering af kemiske farer er vigtigt at tage højde for status af p53, genetisk (karotypens) stabilitet, DNA-reparationskapacitet og oprindelse (gnavere eller mennesker) af de celler, der er udvalgt til test. Brugerne af denne forsøgsmetode opfordres således til at overveje, hvilken indflydelse disse og andre celleegenskaber har på, hvordan en cellelinje kan afsløre induktion af mikrokerner, da viden på dette område hele tiden udvikler sig.

De anvendte definitioner er forklaret i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

Normalt kræver en in vitro-test, at der benyttes en eksogen kilde til metabolisk aktivering, medmindre cellerne er metabolisk kompetente i forhold til testkemikalierne. Metabolismeaktiveringssystemet efterligner ikke in vivo-betingelserne fuldstændig. Man må omhyggeligt undgå betingelser, der kan føre til artefakte positive resultater, der ikke afspejler testkemikalernes genotoksicitet. Disse betingelser omfatter ændringer i pH (41) (42) (43) eller osmolalitet, interaktion med celledyrkningsmediet (44) (45) eller for høje niveauer af cytotoxicitet (se punkt 29).

Ved analyse af induktion af mikrokerner er det afgørende, at både behandlede og ubehandlede kulturer har gennemgået mitose. Den mest informative fase for scoring af mikrokerner er i celler, som har afsluttet mitosen under eller efter behandling med testkemikaliet. For fremstillede nanomaterialer er der behov for særlige tilpasninger af denne forsøgsmetode, men de er ikke beskrevet i denne forsøgsmetode.

Før brug af forsøgsmetoden til lovmæssig test af en blanding til generering af data bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.

PRINCIP FOR TESTEN

Cellekulturer fra mennesker eller andre pattedyr eksponeres for testkemikaliet både med og uden en eksogen metabolisk aktiveringskilde, medmindre der anvendes celler med tilstrækkelig metaboliseringssevne (se punkt 19).

Under eller efter eksponering for testkemikaliet dyrkes cellerne længe nok til, at kromosomskade eller andre indvirkninger på celleyklusen/celledelingen medfører dannelse af mikrokerner i interfaseceller. Ved induktion af aneuploidi bør testkemikaliet normalt være til stede under mitosen. Høstede og farvede interfaseceller analyseres for tilstedeværelse af mikrokerner. Ideelt set bør mikrokerner kun scores i celler, som har afsluttet mitosen under eksponering for testkemikaliet eller i påkommende tilfælde i perioden efter behandlingen. I kulturer, som er blevet behandlet med et cytokinesblokerende stof, gøres dette nemt ved kun at score binukleære celler. Såfremt der ikke anvendes et cytokinesblokerende stof, er det vigtigt at påvise, at det er sandsynligt, at de analyserede celler har delt sig, hvilket baseres på en stigning i cellepopulationen under eller efter eksponering for testkemikaliet. For alle protokoller er det vigtigt at påvise, at der er sket celleproliferation i både kontrolkulturerne og de behandlede kulturer, og omfanget af den testkemikalieinducerede cytotoxicitet eller cytostase bør vurderes i alle kulturer, som scores for forekomst af mikrokerner.

BESKRIVELSE AF METODEN

Celler

Der kan anvendes dyrkede primære perifere blodlymfocytter fra mennesker eller andre pattedyr (7) (20) (46) (47) og en række cellelinjer fra gnavere såsom CHO-, V79-, CHL/IU- og L5178Y-celler eller andre humane cellelinjer som TK6 (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (se punkt 6). Andre cellelinjer såsom HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), HepG2-celler (52) (53), A549 og primære embryoceller fra syrisk hamster (54) er blevet anvendt til mikrokernetest, men er endnu ikke blevet grundigt valideret. Anvendelsen af disse cellelinjer og -typer bør derfor være baseret på dokumenteret ydeevne i testen som beskrevet i afsnittet om acceptkriterier. Cyto B blev rapporteret som havende potentiel indflydelse på L5178Y-cellevækst og kan derfor ikke anbefales til denne cellelinje (23). Når der anvendes primære celler, bør det af hensyn til dyrevelfærden overvejes at anvende celler fra mennesker, hvis det er muligt, og disse bør indsamles i overensstemmelse med menneskelige etiske principper og regler.

Perifere blodlymfocytter fra mennesker bør udtages fra unge (ca. 18-35 år), ikkerygende personer uden kendt sygdom eller nylige eksponeringer for genotoksiske stoffer (f.eks. kemikalier, ioniserende stråling) i et niveau, der vil øge baggrundsforekomsten af mikrokerneceller. Det vil sikre en lav og konsekvent baggrundsforekomst af mikrokerneceller. Den grundlæggende forekomst af mikrokerneceller stiger med alderen, og denne tendens er mere markant hos kvinder end hos mænd (55). Hvis celler fra mere end en donor pooles, bør antallet af donorer angives. Det er nødvendigt at påvise, at cellerne er delt fra begyndelsen af behandlingen med testkemikaliets til prøveudtagning. Cellekulturer fastholdes i en eksponentiel vækstfase (cellelinjer) eller stimuleres til at dele sig (primære kulturer af lymfocytter) for at eksponere cellerne på forskellige stadier af cellecyklussen, da cellefasernes følsomhed over for testkemikalierne muligvis ikke kendes. De primære celler, der skal stimuleres med mitogenstoffer for at dele sig, synkroniseres generelt ikke længere under eksponering for testkemikaliets (f.eks. humane lymfocytter efter 48 timers stimulering med mitogen). Det frarådes at bruge synkroniserede celler under behandlingen med testkemikaliets, men det kan accepteres, såfremt det er berettiget.

Medier og dyrkningsbetingelser

Til vedligeholdelse af kulturerne benyttes der egnede dyrkningsmedier og inkubationsbetingelser (dyrkningsflasker, fugtig atmosfære på 5 % CO₂, hvor det er relevant, temperatur på 37 °C). Cellelinjerne kontrolleres regelmæssigt for stabilt karakteristisk kromosomtal og fravær af mykoplasma kontaminering, og i tilfælde af kontaminering, eller hvis det karakteristiske kromosomtal har ændret sig, anvendes cellerne ikke. Den normale cyklostid for cellelinjer eller primære kulturer, der benyttes i laboratoriet, fastslås og bør være i overensstemmelse med de offentliggjorte celleegenskaber.

Fremstilling af kulturer

Cellelinjer: Celler udtages fra stamkulturer og udsås i dyrkningsmedium med en sådan tæthed, at cellerne i suspension eller i encellede lag vil fortsætte med at vokse eksponentielt, indtil de høstes (f.eks. bør konfluens undgås for celler, der vokser i encellede lag).

Lymfocytter: Fuldblod, der er behandlet med antikoaguleringsmiddel (f.eks. heparin), eller fraseparerede lymfocytter dyrkes (f.eks. i 48 timer for humane lymfocytter) med tilstedeværelse af et mitogen [f.eks. phytohemagglutinin (PHA) for humane lymfocytter] for at fremkalde celledeling inden eksponering for testkemikaliets og cytoB.

Metabolisk aktivering

Eksogene metaboliserende systemer anvendes, når der gøres brug af celler med utilstrækkelige endogene metaboliske egenskaber. Det mest almindeligt anvendte system, der anbefales som standard, medmindre der er begrundelse for at anvende et andet system, er en cofaktorsuppleret postmitokondriefraktion (S9), der fremstilles af lever fra gnave (normalt rotter), der har været behandlet med enzyminducerende stoffer såsom Aroclor 1254 (56) (57) eller en blanding af phenobarbiton og β -naphthoflavon (58) (59) (60). Sidstnævnte blanding er ikke i strid med Stockholmkonventionen om persistente organiske miljøgifte (61) og har vist sig at være lige så effektiv som Aroclor 1254 til induktion af oxidaser med blandet funktion (58) (59) (60). S9-fraktionen anvendes normalt i en koncentration på 1-2 % (v/v), men kan øges til 10 % (v/v) i det færdige testmedium. Brug af produkter, der nedsætter mitoseindekset, især calciumkompleksdannere (62), bør undgås under behandlingen. Valget af type og koncentration af exogent metabolismeaktiveringssystem eller anvendte metaboliske inducerende stoffer kan påvirkes af den testede kemikaliegruppe.

Præparering af testkemikaliets

Testkemikalier i fast form bør præpareres i passende opløsningsmidler og fortyndes eventuelt inden behandling af cellerne. Testkemikalier i væskeform kan enten tilsættes direkte til testsystemet og/eller fortyndes inden behandlingen af testsystemet. Gasser og flygtige testkemikalier bør testes ved passende modifikation af standardprotokollerne, f.eks. i forseglede flasker (63) (64) (65). Der bør laves præparater af testkemikaliets lige inden behandlingen, medmindre stabilitetsdata påviser, at opbevaring er acceptabelt.

Testbetingelser

Opløsningsmidler

Opløsningsmidlet vælges for at optimere testkemikaliet's opløselighed uden at påvirke assayets adfærd negativt, f. eks. ændring af cellevækst, påvirkning af testkemikaliet's integritet, reaktion med dyrkningsflasker eller blokering af metabolismeaktiveringssystemet. Det anbefales så vidt muligt først at overveje at anvende et vandigt opløsningsmiddel (eller dyrkningsmedium). Veletablerede opløsningsmidler er vand eller dimethylsulfoxid (DMSO). Generelt bør organiske opløsningsmidler ikke overstige 1 % (v/v). Hvis cytoB opløses i DMSO, bør den samlede mængde organiske opløsningsmidler, der anvendes til både testkemikaliets og cytoB, ikke overstige 1 % (v/v); ellers bør ubehandlede kontrolgrupper anvendes for at sikre, at andelen af organisk opløsningsmiddel ikke har nogen negativ indvirkning. Vandige opløsningsmidler (saltvand eller vand) må ikke overstige 10 % (v/v) i det færdige behandlingsmedium. Hvis der anvendes andet end ikke-veletablerede opløsningsmidler (f.eks. ethanol eller acetone), bør de underbygges af kompatibilitetsdata med testkemikaliets, testsystemet og fraværet af genetisk toksicitet ved den anvendte koncentration. Uden disse understøttende data er det vigtigt at medtage ubehandlede kontroller (se tillæg 1) samt kontroller af opløsningsmidlet for at påvise, at det valgte opløsningsmiddel ikke forårsager skadevirkninger eller kromosomvirkninger (f.eks. aneuploide eller klastogene virkninger).

Anvendelse af cytoB som cytokinesblokerende stof

Et af de vigtigste aspekter i forbindelse med MNvit-testen er at sikre, at de scorede celler har afsluttet mitosen under behandlingen eller i påkommende tilfælde i inkubationsperioden efter behandlingen. Scoringen af mikrokernerne bør således begrænses til celler, der har undergået mitose under eller efter behandling. CytoB har været det mest anvendte stof til at hæmme cytokinese, da det hæmmer samlingen af aktin og således forhindrer deling af datterceller efter mitose, hvilket resulterer i dannelsen af binukleære celler (6) (66) (67). Testkemikaliet indvirkning på celleproliferationens kinetik kan måles samtidigt, når der anvendes cytoB. CytoB bør anvendes som cytokinesblokerende stof, når der gøres brug af humane lymfocytter, da cellecykluslængder varierer mellem donorer, og da det ikke er alle lymfocytter, der reagerer på PHA-stimulation. CytoB er ikke obligatorisk for andre celletyper, hvis det kan fastslås, at de har delt sig som beskrevet i afsnit 27. Desuden bruges cytoB generelt ikke, når prøver bedømmes for mikrokerner med flowcytometriske metoder.

Laboratoriet bør vælge den passende koncentration af cytoB for hver celletype for at opnå den optimale forekomst af binukleære celler i kontrolkulturerne med opløsningsmiddel, og det bør påvises, at den giver et godt udbytte af binukleære celler til scoring. Den passende koncentration af cytoB ligger normalt mellem 3 og 6 µg/ml (19).

Måling af celleproliferation og cytotoxicitet og valg af behandlingskoncentrationer

Ved valg af højeste koncentration af testkemikaliet bør man undgå koncentrationer, der kan frembringe artefakt positiv respons, f.eks. koncentrationer, der frembringer for høj cytotoxicitet (se punkt 29), udfældning i dyrkningsmediet (se punkt 30) eller væsentlige ændringer i pH eller osmolalitet (se punkt 9). Hvis testkemikaliet frembringer en væsentlig ændring i mediets pH på tilsætningstidspunktet, kan pH-værdien justeres ved bufring af det endelige behandlingsmedium for at undgå et artefakt positivt resultat og for at opretholde passende dyrkningsbetingelser.

Målinger af celleproliferation foretages for at sikre, at tilstrækkeligt mange behandlede celler har undergået mitose under testen, og at behandlingerne udføres med passende cytotoxicitet (se punkt 29). Cytotoxiciteten bestemmes i hovedforsøget med og uden metabolismeaktivering ved hjælp af en passende indikator for celledød og -vækst (se punkt 26 og 27). Selv om det kan være nyttigt at evaluere cytotoxicitet ved en indledende foreløbig test for at sikre en bedre definition af de koncentrationer, der skal anvendes i hovedforsøget, er en indledende test ikke obligatorisk. Hvis en sådan test udføres, bør den ikke erstatte måling af cytotoxicitet i hovedforsøget.

Behandling af kulturer med cytoB og måling af de relative forekomster af mononukleære, binukleære og multinukleære celler i kulturen er en nøjagtig metode til kvantificering af indvirkningen på celleproliferationen og en behandlings cytostatiske eller cytostatiske virkning (6) og sikrer, at det udelukkende er celler, som delte sig under eller efter behandling, der scores ved mikroskopering. Proliferationsindekset for cytokinesblokering (CBPI) (6) (27) (68) eller replikationsindekset (RI) ud fra mindst 500 celler pr. kultur (se formlerne i tillæg 2) anbefales til at vurdere den cytostatiske og cytostatiske virkning af en behandling gennem sammenligning af værdier i de behandlede kulturer og kontrolkulturerne. Vurdering af andre indikatorer for cytotoxicitet (f.eks. celleintegritet, apoptose, nekrose, antal metafaser, cellecyklus) vil kunne give nyttige oplysninger, men bør ikke anvendes i stedet for CBPI eller RI.

I undersøgelser uden cytoB er det nødvendigt at påvise, at cellerne i kulturen har delt sig, således at en betydelig andel af de scorede celler er blevet delt under eller efter behandling med testkemikaliet, idet der i modsat fald kan fremkaldes en falsk negativt respons. Måling af relativ populationsfordobling (RPD) eller relativ forøgelse af celletal (RICC) anbefales til at vurdere den cytotoxiske og cytostatiske virkning af en behandling (17) (68) (69) (70) (71) (se formlerne i tillæg 2). Ved udvidede prøveudtagningstidspunkter (f.eks. behandling af 1,5-2 gange normal celleykluslængde og høst efter yderligere 1,5-2 gange normal celleykluslængde, som medfører prøveudtagnings-tidspunkter, der er 3-4 gange længere end de samlede normale celleykluslængder som beskrevet i punkt 38 og 39), kan RPD medføre, at cytotoxiciteten undervurderes (71). Under disse omstændigheder kan RICC være et bedre mål, eller evaluering af cytotoxicitet efter 1,5-2 gange normal celleykluslængde kan være et nyttigt estimat. Vurdering af andre cytotoxicitets- eller cytostasemarkører (f.eks. celleintegritet, apoptose, nekrose, antal metafaser, proliferationsindeks (PI) celleyklus, nukleoplasmiske broer eller kerneknopper) vil kunne give nyttige oplysninger, men bør ikke anvendes i stedet for hverken RPD eller RICC.

Mindst tre testkoncentrationer (herunder ikke opløsningsmiddel og positive kontroller), der opfylder acceptkriterierne (passende cytotoxicitet, antal celler mv.), bør vurderes. Uanset hvilke typer celler (cellelinjer eller primærkulturer af lymfocytter), det drejer sig om, kan der ved hver af de testede koncentrationer anvendes enten replikater eller enkelte behandlede kulturer. Selv om det anbefales at benytte duplikate kulturer, accepteres anvendelse af enkeltkulturer også, forudsat at det samme totale celleantal scores i enten enkeltkulturer eller dublikate kulturer. Brug af enkeltkulturer er især relevant ved vurdering af mere end tre koncentrationer (jf. punkt 44-45). De resultater, der er opnået fra uafhængige replikater i en given koncentration, kan samles med henblik på dataanalyse. For testkemikalier, der udviser ringe eller ingen cytotoxicitet, vil koncentrationsintervaller på ca. 2 til 3 gange normalt være egnede. Hvis der forekommer cytotoxicitet, bør de valgte testkoncentrationer dække et interval fra det, der frembringer cytotoxicitet som beskrevet i punkt 29, til koncentrationer, hvor der er moderat og ringe eller ingen cytotoxicitet. Mange testkemikalier udviser kraftige koncentrationsresponskurver, og for at indhente data ved lav og moderat cytotoxicitet eller undersøge dosis/respons-forholdet nærmere vil det være nødvendigt at bruge mere samlede koncentrationer og/eller mere end tre koncentrationer (enkeltekulturer eller replikater) — navnlig i situationer, hvor der er behov for at gentage forsøget (jf. punkt 60).

Hvis den maksimale koncentration er baseret på cytotoxicitet, bør den højeste koncentration sigte mod at opnå 55 ± 5 % cytotoxicitet ved hjælp af de anbefalede cytotoxicitetsparametre (dvs. reduktion af RICC og RPD for cellelinjer, når cytoB ikke anvendes, og reduktion af CBPI eller RI, når cytoB anvendes, til 45 ± 5 % af den sideløbende negative kontrol) (72). Man bør være forsigtig med fortolkningen af positive resultater, der kun findes i den høje ende af dette område for cytotoxicitet på 55 ± 5 % (71).

For tungtopløselige testkemikalier, der ikke er cytotoxiske ved koncentrationer, der er lavere end den laveste uopløselige koncentration, bør den højeste analyserede koncentration producere uklarheder eller bundfald, som er synligt med det blotte øje eller ved hjælp af et inverteret mikroskop efter afslutningen af behandlingen med testkemikaliet. Selv om der forekommer cytotoxicitet over den laveste uopløselige koncentration, tilrådes det at gennemføre testen ved kun en koncentration, der frembringer uklarhed eller synligt bundfald, fordi artefakte virkninger kan skyldes bundfaldet. Ved den koncentration, der frembringer bundfald, bør det omhyggeligt sikres, at bundfaldet ikke griber forstyrrende ind i udførelsen af testen (f.eks. farvning eller scoring). Det kan være nyttigt at bestemme opløseligheden i dyrkningsmediet inden forsøget.

Hvis der ikke observeres bundfald eller begrænsende cytotoxicitet, bør testkoncentrationen højst være 10 mM, 2 mg/ml eller 2 µl/ml (den laveste af de tre) (73) (74) (75). Når teststoffets sammensætning ikke er defineret, f.eks. et stof af ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer (UVCB) (76), miljømæssige udtræk mv., kan det være nødvendigt at øge den højeste koncentration (f.eks. 5 mg/ml) ved manglende tilstrækkelig cytotoxicitet for at øge koncentrationen af de enkelte komponenter. Det bør dog bemærkes, at disse krav kan variere for humanlægemidler (93).

Kontroller

Der bør i hver høst indgå samtidige negative kontroller (se punkt 21), hvor behandlingsmediet kun består af opløsningsmiddel, og som behandles på samme måde som de øvrige kulturer.

Der skal foretages samtidige positive kontroller for at påvise, at laboratoriet er i stand til at identificere klastogener og aneugener i henhold til testprotokollen, og effektiviteten af det exogene metabolismeaktiveringssystem, hvor det er relevant. Eksempler på positive kontroller er anført i tabel 1 nedenfor. Alternative positive kontrolkemikalier kan anvendes, hvis der er belæg for det.

For indeværende er der ingen kendte aneugener, som kræver metabolisk aktivering, for at deres genotoksiske virkninger kan bedømmes (17). Eftersom in vitro-test af pattedyrceller for genetisk toksicitet er tilstrækkeligt standardiserede til kortvarige behandlinger, der udføres samtidig med og uden metabolisk aktivering af samme behandlingsvarighed, kan brugen af positive kontroller begrænses til en klastogen, som kræver metabolisk aktivering. I dette tilfælde vil en enkelt positive kontrolrespons hos klastogenet påvise såvel aktiviteten hos det metaboliske aktiveringssystem som testsystemets reaktionsevne. Langtidsbehandling (uden S9) bør dog have sin egen positive kontrol, da behandlingens varighed er forskellig fra testen med metabolisk aktivering. Hvis et klastogen er valgt som fælles positiv kontrol for kortvarig behandling med og uden metabolisk aktivering, bør der vælges et aneugen til langvarig behandling uden metabolisk aktivering. Positive kontrolprøver for både klastogenicitet og aneugenicitet bør anvendes i metabolisk kompetente celler, som ikke kræver S9.

Hver positiv kontrol bør anvendes ved en eller flere koncentrationer, der forventes at give reproducerbare og påviselige forøgelse i forhold til baggrundsværdierne, for at påvise testsystemets følsomhed (dvs. virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede objektglas' identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser dem), og responsen bør ikke kompromitteres på grund af cytotoxicitet, der overskrider de grænser, der er fastsat i denne forsøgsmetode.

Tabel 1

Anbefalede referencekemikalier til vurdering af laboratoriets kompetence og udvælgelsen af positive kontroller

Kategori	Kemikalie	CASRN
1. Aktive klastogener uden metabolisk aktivering		
	Methylmethansulfonat	66-27-3
	Mitomycin C	50-07-7
	4-Nitroquinolin-N-Oxid	56-57-5
	Cytosinarabinosid	147-94-4
2. Klastogener, som kræver metabolisk aktivering		
	Benzo(a)pyren	50-32-8
	Cyclofosfamid	50-18-0

Kategori	Kemikalie	CASRN
3. Aneugener		
	Colchicin	64-86-8
	Vinblastin	143-67-9

FREM GANGSMÅDE

Behandlingsplan

For at maksimere sandsynligheden for at påvise aneugeners eller klastogeners aktivitet i en bestemt fase af celleyklusen er det vigtigt, at et tilstrækkeligt antal celler, der repræsenterer de forskellige faser i deres celleyklusser, behandles med testkemikaliet. Alle behandlinger bør indledes og afsluttes, mens cellerne vokser eksponentielt, og cellernes vækst bør fortsætte frem til prøveudtagningstidspunktet. Behandlingsplanen for cellelinjer og primære cellekulturer kan derfor være forskellig fra behandlingsplanen for lymfocytter, der kræver stimulering med mitogen for at sætte celleyklusen i gang (17). For lymfocytter er den mest effektive metode at indlede behandlingen med testkemikaliet 44-48 timer efter PHA-stimulering, hvor cellerne vil dele sig asynkront (6).

Offentliggjorte data (19) viser, at de fleste aneugener og klastogener vil blive påvist efter en kortvarig behandlingsperiode på 3-6 timer med eller uden tilsætning af S9, efterfølgende fjernelse af testkemikaliet og prøveudtagning på et tidspunkt, der svarer til omkring 1,5-2 gange en normal celleyklus, når behandlingen er indledt (7).

For en grundig evaluering, som vil være nødvendig for at få et negativt resultat, bør alle tre følgende forsøgsbetingelser dog gennemføres med en kortvarig behandling med og uden metabolisk aktivering og langtidsbehandling uden metabolisk aktivering (jf. punkt 56, 57 og 58):

- Cellerne bør udsættes for testkemikaliet uden metabolisk aktivering i 3-6 timer, og prøven udtages efter et tidsrum, der svarer til ca. 1,5-2,0 gange celleykluslængden, regnet fra behandlingens begyndelse (19),
- Cellerne bør eksponeres for testkemikaliet med metabolisk aktivering i 3-6 timer, og prøven udtages efter et tidsrum, der svarer til ca. 1,5-2,0 gange celleykluslængden, regnet fra behandlingens begyndelse (19),
- Celler bør kontinuerligt eksponeres uden metabolisk aktivering indtil prøveudtagning efter et tidsrum, der svarer til ca. 1,5-2,0 gange normal celleykluslængde.

I tilfælde af, at en af ovenstående forsøgsbetingelser fører til et positivt svar, er det muligvis ikke nødvendigt at undersøge nogen af de andre behandlinger.

Hvis man ved eller har mistanke om, at testkemikaliet påvirker celleykluslængden (f.eks. ved test af nucleosidanaloger), navnlig for p53-kompetente celler (35) (36) (77), kan prøveudtagnings- og restitutionperioden forlænges med op til yderligere 1,5-2,0 gange de normale celleykluslængder (dvs. i alt 3,0-4,0 gange celleykluslængden efter påbegyndelsen af korttids- og langtidsbehandlinger). Med disse valgmuligheder tages der højde for situationer, der kan give anledning til bekymring over risikoen for interaktion mellem testkemikaliet og cytoB. Ved brug af udvidede prøveudtagningstidspunkter (dvs. en dyrkningstid på i alt 3,0-4,0 gange celleykluslængden), bør det sikres, at cellerne stadig deler sig aktivt. For lymfocytter kan den eksponentielle vækst f.eks. kan være faldende 96 timer efter stimulering, og etlagscellekulturer kan flyde sammen.

De anbefalede behandlingsplaner er sammenfattet i tabel 2. Disse generelle behandlingsplaner kan ændres (og bør begrundes) afhængigt af testkemikaliet's stabilitet eller reaktivitet eller de anvendte cellers særlige vækstegenskaber.

Tabel 2

Tidsplan for cellebehandling og høst for MNvit-testen

Lymfocytter, primærceller og cellelinjer behandlet <u>med</u> cytoB	+ S9 Kort behandling	Behandl i 3-6 timer med tilsætning af S9. Fjern S9 og behandlingsmediet. Tilsæt frisk medium og cytoB. Høst 1,5-2,0 gange normal cellecykluslængde efter behandlingsstart.
	– S9 Kort behandling	Behandl i 3-6 timer. Fjern behandlingsmediet. Tilsæt frisk medium og cytoB. Høst 1,5-2,0 gange normal cellecykluslængde efter behandlingsstart.
	– S9 Forlænget behandling	Behandl i 1,5-2 gange normal cellecykluslængde med tilsætning af cytoB. Høst ved afslutningen af behandlingsperioden.

Cellelinjer behandlet uden cytoB

(Samme behandlingsplan som anført ovenfor, bortset fra at der ikke tilsættes cytoB)

I encellede kulturer kan der være mitotiske celler (runde celler, der er løsrevet fra overfladen) til stede efter eksponeringen på 3-6 timer. Da disse mitotiske celler let løsriveres, kan de gå tabt, når mediet med testkemikaliet fjernes. Hvis der er grund til at tro, at der sker en betydelig stigning i antallet af mitotiske celler i forhold til kontrollerne, hvilket tyder på en sandsynlig mitosestandsning, bør cellerne indsamles ved centrifugering og tilsættes kulturerne på ny for ikke at miste celler, der er i mitose, og hvor der er risiko for mikrokerne-/kromosomaberration på høsttidspunktet.

Cellehøst og præparering af objektglas

Høst og præparering bør foregå særskilt for hver enkelt kultur. Præpareringen af celler kan bestå i hypotonisk behandling, men dette er ikke nødvendigt, hvis der opnås en tilstrækkelig spredning af cellerne på anden vis. Der kan anvendes forskellige teknikker til præparering af objektglas, forudsat at der fremstilles cellepræparater af høj kvalitet til scoring. Celler med intakt cellemembran og intakt cytoplasma anvendes til påvisning af mikrokerner og (ved cytokinesblokeringsmetoden) pålidelig identifikation af binukleære celler.

Objektglassene kan farves ved hjælp af forskellige metoder, f.eks. med Giemsa- eller fluorescerende DNA-specifikke farvestoffer. Ved at bruge en DNA-specifik fluorescerende farve (f.eks. acridinorange (78) eller Hoechst 33258 plus pyronin-Y (79)) kan man undgå nogle af de artefakter, der optræder ved ikke-DNA-specifik farvning. Antikinetokor-antistoffer, FISH med pancentromeriske DNA-prober eller primet in situ-mærkning med pancentromer-specifikke primere og egnet DNA-kontrastfarvning kan anvendes til identifikation af mikrokerners indhold (hele kromosomer vil blive farvet, mens acentriske kromosomfragmenter ikke vil), hvis der er brug for mekanistisk information om dannelsen heraf (16) (17). Andre metoder til differentiering mellem klastogener og aneugener kan anvendes, hvis de har vist sig at være effektive og er validerede. For visse celler kan målinger af sub-2N-kerner som hypodiploid-hændelser ved hjælp af teknikker såsom billedanalyse, laserskanningcytometri eller flowcytometri også give nyttige oplysninger (80) (81) (82). Endvidere kan morfologiske observationer af celler give et fingerpeg om mulig aneuploidi. Desuden kan en test for metafasekromosomaberrationer, helst på samme celletype og protokol med tilsvarende følsomhed, også være en nyttig metode til at afgøre, om mikrokerner skyldes kromosomskade (velvidende at kromosomtab vil ikke blive opdaget ved kromosomaberrationstesten).

Analyse

Alle objektglas, herunder med opløsningsmiddel og ubehandlede (hvis disse anvendes) og positive kontroller, kodes uafhængigt inden mikroskoperingen til påvisning af hyppigheden af mikrokerner. Egnede metoder bør anvendes til at kontrollere eventuelle systematiske fejl (bias) eller afvigelser ved brug af et automatisk scoringssystem, f.eks. flowcytometri, laserskanningcytometri eller billedanalyse. Uanset hvilken elektronisk platform, der anvendes til at optælle mikrokerner, bør CBPI, RI, RPD eller RICC vurderes samtidigt.

I cytoB-behandlede kulturer analyseres mikrokerneforekomsten i mindst 2 000 binukleære celler pr. koncentration og kontrol (83) ligeligt fordelt mellem replikaterne, hvis der anvendes replikater. Hvis der kun er en kultur pr. dosis (se punkt 28), bør mindst 2 000 binukleære celler pr. kultur (83) scores i denne ene kultur. Hvis der er væsentligt færre end 1 000 binukleære celler pr. kultur (for duplikate kulturer), eller færre end 2 000 (hvis der kun benyttes en kultur) til scoring i hver koncentration, og hvis der ikke påvises en væsentlig forøgelse af antallet af mikrokerner, gentages testen med flere celler eller i mindre cytotoxiske koncentrationer afhængigt af forholdene. Man bør være omhyggelig med ikke at score binukleære celler med uregelmæssige former, eller celler hvor størrelsen af de to kerner er meget forskellig. Desuden må binukleære celler ikke forveksles med multinukleære celler med ringe spredning. Celler med mere end to hovedkerner bør ikke analyseres for mikrokerner, da basisforekomsten af mikrokerner kan være højere i disse celler (84). Scoring af mononukleære celler accepteres, hvis testkemikaliets har vist sig at gribe ind i cytoB-aktiviteten. I sådanne tilfælde kan en ny test uden cytoB være nyttig. Scoring af mononukleære celler som supplement til binukleære celler vil kunne give nyttige oplysninger (85), (86), men er ikke obligatorisk.

I cellelinjer, der er testet uden cytoB-behandling, scores mikrokernerne i mindst 2 000 celler pr. testkoncentration og kontrol (83) ligeligt fordelt mellem replikaterne, hvis der anvendes replikater. Benyttes der kun en kultur pr. koncentration (jf. punkt 28), bør mindst 2 000 celler pr. kultur scores i denne ene kultur. Hvis der er væsentligt færre end 1 000 celler pr. kultur (for duplikate kulturer), eller færre end 2 000 (hvis der kun benyttes en kultur), til bedømmelse i hver koncentration, og hvis der ikke påvises en væsentlig forøgelse af antallet af mikrokerner, gentages testen med flere celler eller i mindre cytotoxiske koncentrationer afhængigt af forholdene.

Når cytoB anvendes, bestemmes CBPI eller RI til vurdering af celleproliferationen (se tillæg 2) ud fra mindst 500 celler pr. kultur. Ved behandling uden tilsætning af cytoB er det afgørende at dokumentere, at cellerne i kulturen har delt sig, jf. punkt 24-28.

Laboratoriets kompetencer

Med henblik på at fastslå, om der foreligger tilstrækkelige erfaringer med assayet, inden det anvendes til rutinetest, bør laboratoriet have udført en række forsøg med positive kemikalier, der fungerer via forskellige mekanismer (mindst en med og en uden metabolisk aktivering og en via en aneugen mekanisme, der er udvalgt blandt de kemikalier, der er opført i tabel 1) og forskellige negative kontroller (herunder ubehandlede kulturer og forskellige opløsningsmidler/bærestoffer). Disse positive og negative kontrolresponser bør være i overensstemmelse med litteraturen. Dette gælder ikke for laboratorier, der har erfaring, dvs. som har en historisk database til rådighed som defineret i punkt 49-52.

Et udvalg af positive kontrolkemikalier (jf. tabel 1) bør undersøges med korte og lange behandlinger uden metabolisk aktivering samt med kort behandling med metabolisk aktivering med henblik på at kunne påvise kompetence i sporing af klastogene og aneogene kemikalier, vurdere effektiviteten af systemet til metabolisk aktivering og påvise relevansen af scoringsprocedurerne (visuel mikroskoperingsanalyse, flowcytometri, laserscanningcytometri eller billedanalyse). Der bør vælges en række koncentrationer af de udvalgte kemikalier, som giver en reproducerbar og koncentrationsafhængig stigning over baggrunden for at påvise testsystemets følsomhed og dynamiske rækkevidde.

Historiske kontroldata

Laboratoriet bør fastlægge:

- et historisk positivt kontrolområde og en historisk positiv kontrolfordeling
- et historisk negativt (ubehandlet, opløsningsmiddel) kontrolområde og en historisk positiv kontrolfordeling.

Når der første gang indhentes data til en historisk negativ kontrolfordeling, bør de samtidige negative kontroller stemme overens med offentliggjorte negative kontroldata, hvis sådanne findes. Efterhånden som der tilføjes flere forsøgsdata til kontrolfordelingen, bør de samtidige negative kontroller ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af denne fordeling (87) (88). Laboratoriets historiske negative kontroldatabase bør i første omgang opbygges med mindst 10 forsøg, men skal helst bestå af mindst 20 forsøg udført under sammenlignelige forsøgsbetingelser. Laboratorierne bør anvende kvalitetskontrolmetoder som f.eks. kontrolkort (f.eks. C-diagrammer eller X-søjlediagrammer (88)) til at identificere, hvor variable deres positive og negative kontroldata er, og vise, at metodologien er "under kontrol" i deres laboratorium (83). Yderligere anbefalinger til, hvordan man opbygger og anvender de historiske data (dvs. kriterier for optagelse og udelukkelse af historiske data og acceptkriterier for et givet forsøg), kan findes i litteraturen (87).

Der bør tages hensyn til eventuelle ændringer af forsøgsprotokollen med hensyn til, om dataene stemmer overens med laboratoriets eksisterende historiske kontroldata. Ved større uoverensstemmelser bør der etableres en ny historisk kontroldatabase.

Negative kontroldata bør bestå af forekomsten af celler med mikrokerner fra en enkelt kultur eller summen af replikate kulturer som beskrevet i punkt 28. Sideløbende negative kontroller bør ideelt set ligge inden for kontrolgrænsen på 95 % af fordelingen af laboratoriets historiske negative kontroldatabase (87) (88). Såfremt data fra sideløbende negative kontroller falder uden for kontrolgrænsen på 95 %, kan de eventuelt optages i den historiske kontrolfordeling, så længe disse data ikke er ekstreme afvigende værdier, og der er dokumentation for, at testsystemet er "under kontrol" (jf. punkt 50), og for, at der ikke er begået tekniske eller menneskelige fejl.

DATA OG RAPPORTERING

Præsentation af resultaterne

Ved cytokinesblokeringsmetoden tages der kun højde for forekomsten af binukleære celler med mikrokerner (uafhængigt af antallet af mikrokerner pr. celle) ved vurdering af induktionen af mikrokerner. Det er ikke obligatorisk at score antallet af celler med en, to eller flere mikrokerner, som kan rapporteres særskilt, men det kan give nyttige oplysninger.

Der foretages sideløbende målinger af cytotoxicitet og/eller cytostase for alle behandlede kulturer samt positive og negative kontrollkulturer (16). Ved cytokinesblokeringsmetoden udregnes CBPI eller RI for alle behandlede kulturer og kontrollkulturer som målinger af cellecyklusforsinkelse. Hvis cytoB ikke anvendes, anvendes RPD- eller RICC-metoden (se tillæg 2).

Der anføres data for hver enkelt kultur. Desuden sammenfattes alle data i tabelform.

Acceptkriterier

Accept af en test er baseret på følgende kriterier:

- Den sideløbende negative kontrol anses for at kunne føjes til laboratoriets historiske negative kontrolldatabase som beskrevet i punkt 50.
- Sideløbende positive kontroller (jf. punkt 50) skal fremkalde responser, der er forenelige med responserne i laboratoriets historiske positive kontrolldatabase, og medføre en statistisk set signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.
- Celleproliferationskriterier i opløsningsmiddelkontrollen bør være opfyldt (punkt 25-27).
- Alle forsøgsbetingelser er blevet testet, medmindre en af dem gav positive resultater (jf. punkt 36-40).
- Antallet af analyserbare celler og koncentrationer er tilstrækkeligt (punkt 28 og 44-46).
- Kriterierne for valg af højeste koncentration er i overensstemmelse med kriterierne i punkt 24-31.

Evaluering og fortolkning af resultater

Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis følgende er opfyldt under en af de undersøgte forsøgsbetingelser (jf. punkt 36-39):

- Mindst en af testkoncentrationerne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol (89).
- Stigningen er dosisafhængig i mindst et forsøg, når den vurderes med en hensigtsmæssig trend test (se punkt 28).
- Et eller flere af resultaterne ligger uden for fordelingen af de historiske negative kontrolldata (f.eks. Poisson-baserede kontrolgrænser på 95 %, jf. punkt 52).

Når alle disse kriterier er opfyldt, anses testkemikaliets for at kunne fremkalde kromosomskader og/eller tilvækst eller tab i dette testsystem. Anbefalinger til de mest hensigtsmæssige statistiske metoder kan også findes i litteraturen (90) (91) (92).

Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart negativt, hvis følgende er opfyldt under alle de undersøgte forsøgsbetingelser (jf. punkt 36-39):

- Ingen af testkoncentrationerne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.
- Der indtræder ikke en koncentrationsafhængig stigning, når der foretages en evaluering med en passende trend test.
- Alle resultaterne ligger inden for fordelingen af de historiske negative kontrolldata (f.eks. Poisson-baserede kontrolgrænser på 95 %, jf. punkt 52).

Testkemikaliet anses herefter for ikke at kunne fremkalde kromosomskader og/eller tilvækst eller tab i dette testsystem. Anbefalinger til de mest hensigtsmæssige statistiske metoder kan også findes i litteraturen (90) (91) (92).

Der er ikke krav om verifikation af en klart positiv eller negativ respons.

Hvis responsen hverken er klart negativ eller positiv som beskrevet ovenfor og/eller for at bidrage til at fastslå den biologiske relevans af et resultat, bør dataene evalueres af eksperter, og/eller der bør foretages yderligere undersøgelser. Scoring af yderligere celler (hvor det er relevant) eller et nyt forsøg, eventuelt med ændrede forsøgsbetingelser (f.eks. koncentrationsinterval, andre metabolismeaktiveringsbetingelser (dvs. S9-koncentration eller S9-oprindelse) kan være nyttigt.

I sjældne tilfælde giver dataene selv efter yderligere undersøgelser ikke mulighed for at konkludere, om resultaterne er positive eller negative; konklusionen er derfor, at resultaterne er tvetydige.

Når testkemikalier inducerer mikrokerner i MNvit-testen, kan det skyldes, at de fremkalder kromosombrud, kromosomtab eller en kombination heraf. Yderligere analyser med anvendelse af anti-kinetokor-antistoffer, centromeriske in situ-prober eller andre metoder kan anvendes til at bestemme, hvorvidt induktionen af mikrokerner skyldes klastogen og/eller aneugen aktivitet.

Testrapport

Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

- oprindelse, batchnummer, frist for anvendelse, hvis dette foreligger
- testkemikaliets stabilitet, hvis dette er kendt
- testkemikaliernes reaktivitet med opløsningsmiddel/bærestof eller celledyrkningsmedium
- testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet, hvis dette er kendt
- måling af pH-værdi, osmolalitet og bundfald i det dyrkningsmedium, som kemikaliet blev tilsat, hvor det er relevant.

Stof med kun en bestanddel:

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

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

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

Opløsningsmiddel:

- begrundelse for valg af opløsningsmiddel
- procentdel af opløsningsmiddel i det endelige dyrkningsmedium.

Celler:

- den valgte celletype og oprindelse
- den valgte celletypes egnethed
- fravær af mycoplasma for cellelinjer
- for cellelinjer oplysninger om celleyklussens længde eller proliferationsindeks
- når der anvendes lymfocytter, bloddonorernes køn, alder og andre relevante oplysninger om donoren, fuldblodslymfocytter eller fraseparerede lymfocytter, benyttet mitogen
- celleyklussens normale længde (negativ kontrol)
- eventuelt antal passager for cellelinjer
- eventuelle metoder til opbevaring af cellekulturer for cellelinjer
- normalt kromosomtal for cellelinjer.

Testbetingelser:

- det cytokinesblokerende stofs (f.eks. cytoB) betegnelse og koncentration samt varigheden af cellernes eksponering for stoffet
- testkemikaliets koncentration udtrykt som endelig koncentration i dyrkningsmediet (f.eks. µg eller mg/ml eller mM af dyrkningsmediet)
- begrundelse for valg af koncentrationer og antal kulturer, herunder cytotoxicitetsdata og opløselighedsbegrænsninger
- mediets sammensætning og eventuel CO₂-koncentration, fugtighedsniveau
- koncentration (og/eller volumen) af opløsningsmidlet og tilsat testkemikalie i dyrkningsmediet
- inkubationstemperatur og -periode
- behandlingens varighed
- høsttidspunkt efter behandling
- celletæthed ved udsåning, hvis det er relevant
- metabolismeaktiveringssystemets type og sammensætning (kilde for S9, metode til fremstilling af S9-sammensætning, koncentration eller volumen af S9-blanding og S9 i det endelige dyrkningsmedium, kvalitetskontrol af S9) (f.eks. enzymatisk aktivitet, sterilitet, metabolisk kapacitet)
- positive og negative kontrolkemikalier, endelige koncentrationer, behandlingsbetingelser og -varighed samt restitutionstider
- anvendte metoder til præparering af objektglas og farvningsteknik
- kriterier for scoring af mikrokerneceller (valg af analyserbare celler og identifikation af mikrokerner)
- antal analyserede celler

- metoder til måling af cytotoxicitet
- eventuelle supplerende oplysninger vedrørende cytotoxicitet og anvendt metode
- kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig
- anvendte statistiske analysemetoder
- metoder som f.eks. anvendelse af anti-kinetokor-antistof eller pan-centromerspecifikke prober til bestemmelse af, om mikrokernerne indeholder hele kromosomer eller kromosomfragmenter, hvor dette er relevant
- anvendte metoder til bestemmelse af pH, osmolalitet og bundfald.

Resultater:

- definition af acceptable celler til analyse
- hvis der ikke anvendes cyto B, antal behandlede celler og antal høstede celler for hver kultur, når der benyttes cellelinjer
- den anvendte måling af cytotoxicitet, f.eks. CBPI eller RI ved anvendelse af cytokinesblokeringsmetoden, RICC eller RPD, når cytokinesblokeringsmetoden ikke anvendes, eventuelle andre observationer (f.eks. cellekonfluens, apoptose, nekrose, antal metafaser, forekomst af binukleære celler)
- tegn på bundfald og tidspunkt for bestemmelse
- data om pH og osmolalitet i behandlingsmediet, hvis disse værdier er målt
- fordeling af mono-, bi- og multinukleære celler ved anvendelse af en cytokinesblokeringsmetode
- antal celler med mikrokerner, anført særskilt for hver behandlet kultur og kontrolkultur, og bestemmelse af, om de er indsamlet fra binukleære eller mononukleære celler, hvis det er relevant
- koncentration/respons-sammenhængen, når det er muligt
- sideløbende negative (opløsningsmiddel) og positive kontrolprøver (koncentrationer og opløsningsmidler)
- historisk negative (opløsningsmiddel) og positive kontroldata med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser og kontrolgrænser på 95 % for fordelingen, samt mængden af data
- statistisk analyse og eventuelle P-værdier.

Diskussion af resultater.

Konklusioner.

LITTERATUR

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 1-4.
- (3) Parry, J.M., A. Sors (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 3-15.
- (4) Fenech, M., A. A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*, Vol. 43/172-173, s. 233-246.

- (5) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 167-172.
- (6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, Vol. 2/5, pp. 1084-1104.
- (7) Fenech, M., A. A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research*, Vol. 161/2, pp. 193-198.
- (8) Eastmond, D. A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 13/1, pp. 34-43.
- (9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research*, Vol. 234/5, pp. 9-20.
- (10) Miller, B.M. *et al.* (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis*, Vol. 6/4, pp. 297-302.
- (11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneuploids in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis* vol. 8/4, s. 329-334.
- (12) Migliore, L. *et al.* (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research*, Vol. 319/3, pp. 205-213.
- (13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochores staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 519-525.
- (14) Eastmond, D.A., D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research*, Vol. 322/1, pp. 9-20.
- (15) Marshall, R.R. *et al.* (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research*, Vol. 372/2, pp. 233-245.
- (16) Zijno, P. *et al.* (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 372/2, 211-219.
- (17) Kirsch-Volders *et al.* (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research*, Vol. 540/2, pp. 153-163.
- (18) Kapitel B.10 i dette bilag: *In vitro*-test for kromosomaberrationer i celler fra pattedyr.
- (19) Lorge, E. *et al.* (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 13-36.
- (20) Clare, G. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 37-60.
- (21) Aardema, M.J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 61-87.
- (22) Wakata, A. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 88-124.

- (23) Oliver, J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 125-152.
- (24) Albertinis, S. *et al.* (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 187-208.
- (25) Miller, B. *et al.* (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 45-59.
- (26) Miller, B. *et al.* (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research*, Vol. 410, pp. 81-116.
- (27) Kalweit, S. *et al.* (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells — comparison of three different test approaches. *Mutation Research*, Vol. 439/2, pp. 183-190.
- (28) Kersten, B. *et al.* (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 445/1, pp. 55-71.
- (29) von der Hude, W. *et al.* (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells — results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Research*, Vol. 468/2, pp. 137-163.
- (30) Garriott, M. L., J. B. Phelps, W. P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 123-134.
- (31) Matsushima, T. *et al.* (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis*, Vol. 14/6, pp. 569-580.
- (32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 1-152.
- (33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro* micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Research*, Vol. 702/2, pp. 139-147.
- (34) Hashimoto K. *et al.* (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 59/1, pp. 28-36.
- (35) Honma, M., M. Hayashi (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 373-384.
- (36) Zhang, L.S. *et al.* (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters*, Vol. 347/3-4, pp. 105-115.
- (37) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC's 25. møde, 16.-17. november 2006, tilgængelig på: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (38) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Tilgængelig på: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (39) Corvi, R. *et al.* (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis*, Vol. 23/4, pp. 271-283.

- (40) ILSI paper (draft). Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research*.
- (41) Scott, D. *et al.* (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research*, Vol. 257/2, pp. 147-205.
- (42) Morita, T. *et al.* (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research*, Vol. 268/2, pp. 297-305.
- (43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789-886.
- (44) Long, L.H. *et al.* (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 Research*, Vol. 634/1-2, pp. 177-183.
- (45) Nesslany, F. *et al.* (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation.*, Vol. 49, pp. 439-452.
- (46) Fenech, M., A. A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 147/1-2, pp. 29-36.
- (47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research*, Vol. 392, pp. 11-18.
- (48) Payne, C. M. *et al.* (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, pp. 825-840.
- (49) Lorge, E. *et al.* (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin, Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, pp. 251-259.
- (50) Le Hegarat, L. *et al.* (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, Vol. 25/6, pp. 555-560.
- (51) Corvi, R. *et al.* (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 295-304.
- (52) Ehrlich, V. *et al.* (2002). Fumonisin B₁ is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis*, Vol. 17/3, pp. 257-260.
- (53) Knasmüller, S. *et al.* (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxins; current state of knowledge. *Toxicology*, Vol. 198/1-3, pp. 315-328.
- (54) Lovell, D.P. *et al.* (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 61-70.
- (55) Bonassi, S. *et al.* (2001). HUMAN MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 37/1, pp. 31-45.
- (56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.
- (57) 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. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, pp. 55-65.

- (58) Elliott, B.M. *et al.* (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, Vol. 7, pp. 175-177.
- (59) Matsushima, T. *et al.* (1976). "A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*. de Serres, F.J. *et al.* (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (60) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 28, pp. 51-59.
- (61) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Tilgængelig på: <http://www.pops.int/>
- (62) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, Vol.190/3, pp. 225-8.
- (63) Krahm, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982). "CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids", in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.
- (64) Zamora, P.O. *et al.* (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.
- (65) Asakura, M. *et al.* (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.
- (66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research*, Vol. 285/1, pp. 35-44.
- (67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W. P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, Vol. 521/1-2, pp. 103-112.
- (68) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2004). Corrigendum to "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group". *Mutation Research*, 564, 97-100.
- (69) Lorge, E. *et al.* (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research*, Vol. 655/1-2, pp. 1-3.
- (70) Surrallès, J. *et al.* (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, Vol. 341/3, pp. 169-184.
- (71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 724, pp. 86-87.
- (72) Pfuhler, S. *et al.* (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 101-107.
- (73) 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). ENV/JM/TG(2014)17. Tilgængelig på anmodning.
- (74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (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 Research*, Vol. 741, pp. 32-56.
- (75) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36-43.

- (76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. <http://www.epa.gov/opptintr/newchemicals/pubs/uvcb.txt>.
- (77) Sobol Z. *et al.* (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research*, Vol.746/1, pp. 29-34.
- (78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 241-247.
- (79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 269-275.
- (80) Bryce, S.M. *et al.* (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/4, pp. 280-286.
- (81) Nicolette, J. *et al.* (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 355-362.
- (82) Shi, J., R. Bezabhe, A. Szkudlinska (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, Vol. 25/1, pp. 33-40.
- (83) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment, No.198, OECD Publishing, Paris.
- (84) Fenech, M. *et al.* (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, Vol. 534/1-2, pp. 65-75.
- (85) Elhajoui, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, Vol. 13/2, pp. 193-8.
- (86) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, Vol. 85/8, pp. 873-99.
- (87) Hayashi, M. *et al.* (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.723/2, pp. 87-90.
- (88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- (89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). "In vitro micronucleus test", in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2nd ed. Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 463-467.
- (90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.
- (91) Galloway, S.M. *et al.* (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.
- (92) Richardson, C. *et al.* (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays. in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.
-

Tillæg 1

DEFINITIONER

Aneugen: Alle kemikalier eller processer, der ved interaktion med komponenterne i det mitotiske og det meiotiske celledelingscyklusapparat forårsager aneuploidi i celler eller organismer.

Aneuploidi: Enhver afvigelse fra det normale diploide (eller haploide) kromosomtallet af et eller flere kromosomer, men ikke af et eller flere komplette kromosomsæt (polyploidi).

Apoptose: Programmeret celledød karakteriseret ved en række trin, der forårsager opløsning af celler i membranbundne partikler, som herefter elimineres ved fagocytose eller afstødning.

Celleproliferation: Forøgelse af celleantal som følge af mitotisk celledeling.

Centromer: DNA-region af et kromosom, hvor begge kromatider holdes sammen, og hvorpå begge kinetokorer er bundet side om side.

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

Koncentrationer: De endelige koncentrationer af testkemikalien i dyrkningsmediet.

Klastogen: Alle kemikalier eller processer, der forårsager strukturelle kromosomaberrationer i populationer af celler eller organismer.

Cytokinese: Celledeling umiddelbart efter mitose, hvorved der dannes to datterceller, som hver indeholder en enkelt kerne.

Proliferationsindeks for cytokinesblokerende stof (CBPI): Andelen af celler efter anden deling i den behandlede population i forhold til den ubehandlede kontrol (se formelen i tillæg 2).

Cytostase: Hæmning af cellevækst (se formelen i tillæg 2)

Cytotoksicitet: For de assays, som er omfattet af denne forsøgsmetode, der gennemføres i fravær af cytochalasin B, identificeres cytotoksicitet som en reduktion i proliferationsindekset for cytokinesblokering (CPPI) eller replikationsindekset (RI) i de behandlede celler sammenlignet med den negative kontrol (jf. punkt 26 og tillæg 2).

For de assays, som er omfattet af denne forsøgsmetode, der gennemføres i fravær af cytochalasin B, identificeres cytotoksicitet som en reduktion i den relative populationsfordobling (RPD) eller den relative forøgelse af celletal (RICC) i de behandlede celler sammenlignet med den negative kontrol (jf. punkt 27 og tillæg 2).

Genotoksisk: Generelt udtryk, der omfatter alle former for DNA- eller kromosombeskadigelse, herunder brud, deletioner, addukter, ændringer af nukleotider og koblinger, omlejninger, genmutationer, kromosomaberrationer og aneuploidi. Det er ikke alle former for genotoksiske virkninger, der forårsager mutationer eller stabil kromosomskade.

Interfaseceller: Celler, der ikke er i mitosefase.

Kinetokor: Proteinstruktur, der samles ved et kromosoms centromer, hvortil tentrådene er påhæftet under celledeling, således at datterkromosomerne kan ordnes i forhold til dattercellernes poler.

Mikrokerner: Små ekstrakerner, der er adskilt fra cellens hovedkerne, og som dannes under mitosens eller meiosens telofase ud fra efterladte kromosomfragmenter eller hele kromosomer.

Mitose: Deling af cellekernen, der normalt inddeles i profase, prometafase, metafase, anafase og telofase.

Mitoseindeks (MI): Forholdet mellem antallet af celler i metafase og det samlede antal celler i en population; viser populationens formeringsgrad.

Mutagen: Forårsager arvelige ændringer af DNA-baseparssekvens(er) i gener eller i kromosomstrukturen (kromosomaberrationer).

Non-disjunction: Forbundne kromatiders manglende evne til at dele sig og spalte sig korrekt til datterceller under udvikling, hvorved der dannes datterceller med anormale kromosomtal.

p53-status: p53-protein indgår i cellegyklusregulering, apoptose og DNA-reparation. Celler, der mangler funktionelt p53-protein, og som ikke kan standse cellegyklessen eller eliminere beskadigede celler via apoptose eller andre mekanismer (f.eks. induktion af DNA-reparation), som vedrører p53-funktioner som reaktion på DNA-beskadigelse, bør teoretisk set være mere modtagelige for genmutationer eller kromosomaberrationer.

Polyploidi: Numeriske kromosomaberrationer i celler eller organismer, der involverer et eller flere komplette kromosomsæt, men ikke et enkelt kromosom eller kromosomer (aneuploidi).

Proliferationsindeks (PI): Metode til måling af cytotoxicitet, hvis der ikke anvendes cytoB (se formelen i tillæg 2).

Relativ forøgelse af celletal (RICC): Metode til måling af cytotoxicitet, hvis der ikke anvendes cytoB (se formelen i tillæg 2).

Relativ populationsfordobling (RPD): Metode til måling af cytotoxicitet, hvis der ikke anvendes cytoB (se formelen i tillæg 2).

Replikationsindeks (RI): Andel af afsluttede celledelingscykluser i den behandlede kultur i forhold til den ubehandlede kontrol i eksponerings- og restitutionsfasen (se formelen i tillæg 2).

S9-leverfraktion: Supernatant fra leverhomogenat efter 9 000 g centrifugering, dvs. ekstrakt fra rå lever.

S9-blanding: Blanding af S9-leverfraktionen og andre medvirkende faktorer, som er nødvendige for at skabe metabolisk enzymaktivitet.

Opløsningsmiddelkontrol: Generelt begreb, der angiver de kontrolkulturer, som kun modtager det opløsningsmiddel, der anvendes til at opløse testkemikaliet.

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

Ubehandlet kontrol: Kulturer, der ikke modtager behandling (dvs. hverken testkemikalie eller opløsningsmiddel), men behandles sideløbende på samme måde som de kulturer, der modtager testkemikaliet.

Tillæg 2

FORMLER TIL VURDERING AF CYTOTOKSICITET

Hvis cytoB anvendes, baseres evalueringen af cytotoxicitet på **proliferationsindekset for cytokinesblokerende stof (CBPI)** eller **replikationsindekset (RI)** (17) (69). CBPI angiver det gennemsnitlige antal kerner pr. celle og kan anvendes til at beregne celleproliferationen. RI angiver det relative antal cellecyklusser pr. celle i perioden med eksponering for cytoB i behandlede kulturer sammenholdt med kontrolkulturerne og kan anvendes til at beregne cytostase i procent.

$$\% \text{ cytostase} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

og

T = kultur til behandling af testkemikalier

C = kontrolkultur

hvor

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{antal mononukl.celler}) + (2 \times \text{antal mononukl.celler}) + (3 \times \text{antal mononukl.celler}))}{(\text{antal celler i alt})}$$

et CBPI på 1 (alle celler er mononukleære) svarer til en cytostase på 100 %.

Cytostase = 100-RI

$$\text{RI} = \frac{((\text{antal binukl.celler}) + (2 \times \text{antal multinukl.celler})) / (\text{antal celler i alt})_T}{((\text{antal binukl.celler}) + (2 \times \text{antal multinukl.celler})) / (\text{antal celler i alt})_C} \times 100$$

T = behandlede kulturer

C = kontrolkulturer

Et RI på 53 % angiver således, at i forhold til antallet af celler, der delte sig til binukleære og multinukleære celler i kontrolkulturen, var der kun 53 % af disse celler, der delte sig i den behandlede kultur, dvs. 47 % cytostase.

Hvis cytoB ikke anvendes, anbefales evaluering af cytotoxicitet baseret på **relativ forøgelse af celletal (RICC)** eller **relativ populationsfordobling (RPD)** (69), da der ved begge metoder tages højde for den andel af cellepopulationen, som har delt sig.

$$\text{RICC}(\%) = \frac{(\text{stigning i antal celler i behandlede kulturer}(\text{slut} - \text{start}))}{(\text{stigning i antal celler i kontrolkulturer}(\text{slut} - \text{start}))} \times 100$$

$$\text{RPD}(\%) = \frac{(\text{antal populationsfordoblinger i behandlede kulturer})}{(\text{antal populationsfordoblinger i kontrolkulturer})} \times 100$$

hvor:

Populationsfordobling = $[\log (\text{celleantal efter behandling} \div \text{oprindeligt celleantal})] \div \log 2$

Et RICC eller RPD på 53 % angiver således 47 % cytotoxicitet/cytostase.

Ved anvendelse af et **proliferationsindeks (PI)** kan cytotoxiciteten vurderes ved optælling af antallet af kloner med 1 celle (cl1), 2 celler (cl2), 3-4 celler (cl4) og 5-8 celler (cl8).

$$\text{PI} = \frac{((1 \times \text{cl1}) + (2 \times \text{cl2}) + (3 \times \text{cl4}) + (4 \times \text{cl8}))}{(\text{cl1} + \text{cl2} + \text{cl4} + \text{cl8})}$$

PI er også blevet anvendt som en værdifuldt og pålideligt cytotoxicitetsparameter for celler dyrket in vitro uden cytoB (35) (36) (37) (38) og kan betragtes som en nyttig supplerende parameter.

Under alle omstændigheder bør antallet af celler inden behandling være det samme for behandlede og negative kontrolkulturer.

Selv om RCC (dvs. antal celler i behandlede kulturer/antal celler i kontrolkulturer) tidligere er blevet brugt som cytotoxicitetsparameter, anbefales dette ikke længere, da cytotoxiciteten kan undervurderes.

Ved hjælp automatiserede scoringssystemer, f.eks. flowcytometri, laserskanningcytometri eller billedanalyse, kan antallet af celler i formlen erstattes af antallet af kerner.

I de negative kontrolkulturer bør populationsfordobling eller replikationsindeks være forenelige med kravet om udtagning af celler efter behandling efter et tidsrum, der svarer til ca. 1,5-2,0 gange normal cellecyklus.»

15) I del B indsættes følgende kapitler:

»B.59 In chemico-hudsensibilisering: direkte peptidreaktivitetsassay (DPRA)

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline (TG)) 442C (2015). Et hudsensibiliserende stof er et stof, der fremkalder en allergisk reaktion ved hudkontakt som defineret ved De Forenede Nationers globalt harmoniserede system til klassificering og mærkning af kemikalier (UN GHS) (1) og forordning (EF) nr. 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP-forordningen) ⁽¹⁾. Denne forsøgsmetode indeholder en kemisk procedure (direkte peptidreaktivitetsassay — DPRA), der anvendes til at underbygge sondringen mellem hudsensibiliserende og ikke-hudsensibiliserende stoffer i henhold til UN GHS og CLP.

Der hersker almindelig enighed om de centrale biologiske begivenheder, som ligger til grund for hudsensibilisering. Den nuværende viden om kemiske og biologiske mekanismer i forbindelse med hudsensibilisering er sammenfattet i form af en Adverse Outcome Pathway (AOP) (2) fra den molekylære udløsende begivenhed gennem de mellemliggende begivenheder til den skadelige virkning, nemlig allergisk kontaktdermatitis hos mennesker eller kontaktoverfølsomhed hos gnavere. I hudsensibilisering-AOP'en er den molekylære udløsende begivenhed den kovalente binding af elektrofile stoffer til nuklofile centre i hudproteiner.

Vurderingen af hudsensibilisering har typisk omfattet brug af laboratoriedyr. Med de klassiske metoder baseret på marsvin, Guinea Pig Maximisation Test (GPMT) og Buehler-testen (TM B.6 (3)), undersøger man både induktions- og udløsningsfasen ved hudsensibilisering. En musetest, assay på lokale lymfeknuder (Local Lymph Node Assay (LLNA), TM B.42 (4)) og dens to ikke-radioaktive ændringer, LLNA: DA (TM B.50 (5)) og LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (6)), som alle udelukkende vurderer induktionsresponsen, er også blevet accepteret, eftersom de indebærer en fordel i forhold til marsvinetest, hvad angår dyrevelfærd og en objektiv måling af induktionsfasen for hudsensibilisering.

På det seneste har man anset mekanistisk baserede in chemico- og in vitro-forsøgsmetoder for videnskabeligt gyldige til evaluering af kemikaliers hudsensibiliseringsfare. Men der vil være behov for kombinationer af metoder uden brug af dyr (in silico, in chemico, in vitro) inden for integrerede tilgange til prøvning og vurdering (IATA) for fuldt ud at kunne erstatte de dyreforsøg, der anvendes i øjeblikket, i lyset af den begrænsede AOP-mekanistiske dækning af hver af de aktuelt tilgængelige forsøgsmetoder uden brug af dyr (2) (7).

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

Det foreslås, at DPRA bruges til at håndtere den molekylære udløsende begivenhed for hudsensibiliserings-AOP'en, nemlig proteinreaktivitet, ved at kvantificere testkemikalernes reaktivitet over for modellens syntetiske peptider, som enten indeholder lysin eller cystein (8). De procentvise nedbrydningsværdier for cystein og lysin bruges herefter til at klassificere et stof i en af fire reaktivitetsklasser, der bruges som grundlag for sondringen mellem hudsensibiliserende og ikke-sensibiliserende stoffer (9).

DPRA er blevet vurderet i en valideringsundersøgelse ledet af et EU-referencelaboratorium for alternativer til dyreforsøg (EURL ECVAM) og en efterfølgende uafhængig peer review udført af EURL ECVAM's videnskabelige rådgivende udvalg (ESAC) og betragtes som videnskabeligt underbygget (10) til brug som en del af en IATA til at underbygge sondringen mellem hudsensibiliserende og ikke-hudsensibiliserende stoffer med henblik på fareklassificering og mærkning. Litteraturen indeholder eksempler på anvendelse af DPRA-data i kombination med andre oplysninger (11) (12) (13) (14).

Definitioner findes i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER, ANVENDELSE OG BEGRÆNSNINGER

Sammenhængen mellem proteinreaktivitet og hudsensibiliseringspotentiale er veldokumenteret (15) (16) (17). Men da proteinbinding kun udgør en vigtig begivenhed, selv om der er tale om den molekylære udløsende begivenhed for hudsensibiliserings-AOP'en, er oplysninger om proteinreaktivitet, der genereres med forsøgs- og ikke-forsøgsmetoder, muligvis ikke i sig selv tilstrækkelige til at konkludere, at kemikalier ikke kan forårsage hudsensibilisering. Derfor bør data genereret med denne forsøgsmetode ses i sammenhæng med integrerede tilgange, såsom IATA, idet de kombineres med andre supplerende oplysninger, f.eks. hidrørende fra in vitro-assays vedrørende andre vigtige begivenheder for hudsensibiliserings-AOP samt ikke-forsøgsmetoder, herunder analogislutninger fra analoge kemikalier.

Denne forsøgsmetode kan anvendes i kombination med andre supplerende oplysninger som begrundelse for forskelsbehandling mellem hudsensibiliserende (dvs. UN GHS-/CLP-kategori 1) og ikke-hudsensibiliserende stoffer i forbindelse med IATA. Denne metode kan ikke anvendes alene, hverken til at kategorisere hudsensibiliserende stoffer i underkategorierne 1A og 1B som defineret i UN GHS/CLP, eller til at forudsige styrken i forbindelse med beslutninger om sikkerhedsvurdering. Afhængigt af den juridiske ramme kan et positivt udfald af DPRA imidlertid anvendes alene til at klassificere et kemikalie i UN GHS-/CLP-kategori 1.

DPRA-forsøgsmetoden har vist sig at kunne overføres til laboratorier, der har erfaring med højtrykvæskechromatografi (HPLC). Graden af reproducerbarhed for de forudsigelser, der kan forventes fra forsøgsmetoden, ligger i størrelsesordenen 85 % inden for laboratorier og 80 % mellem laboratorier (10). Resultater, der er fremkommet i valideringsundersøgelsen (18) og offentliggjorte undersøgelser (19), viser generelt, at nøjagtigheden af DPRA til sontring mellem sensibiliserende stoffer (dvs. UN GHS-/CLP-kategori 1) og ikke-sensibiliserende stoffer er 80 % (N=157) med en følsomhed på 80 % (88/109) og en specificitet på 77 % (37/48) sammenlignet med LLNA-resultater. Det er mere sandsynligt, at DPRA vil føre til for lave forudsigelser for kemiske stoffer med lav til moderat hudsensibiliserende styrke (dvs. UN GHS-/CLP-underkategori 1B) i forhold til kemikalier med høj hudsensibiliserende styrke (dvs. UN GHS-/CLP-underkategori 1A) (18) (19). De nøjagtige værdier, der her angives for DPRA som en selvstændig forsøgsmetode, er imidlertid kun vejledende, da forsøgsmetoden bør betragtes i kombination med andre informationskilder i forbindelse med en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 9 ovenfor. I forbindelse med vurderingen af metoder til test af hudsensibilisering uden brug af dyr bør man desuden holde sig for øje, at LLNA-test samt andre dyreforsøg ikke fuldt ud afspejler situationen hos arten af interesse, dvs. mennesker. På grundlag af de samlede tilgængelige data har DPRA vist sig at være relevant for testkemikalier, der dækker en række forskellige organiske funktionelle grupper, reaktionsmekanismer, hudsensibiliseringsstyrke (som fastlagt ved *in vivo*-undersøgelser) og fysisk-kemiske egenskaber (8) (9) (10) (19). Samlet set viser disse oplysninger nytteværdien af DPRA som bidrag til identifikation af hudsensibiliseringsfare.

Betegnelsen "testkemikalie" anvendes i denne forsøgsmetode om det, der testes, og vedrører ikke anvendeligheden af DPRA til test af stoffer og/eller blandinger. Denne forsøgsmetode er ikke anvendelig til test af metalforbindelser, da de er kendt for at reagere med proteiner gennem andre mekanismer end kovalent binding. Et testkemikalie bør være opløseligt i et passende opløsningsmiddel i en slutkoncentration på 100 mM (se punkt 18). Testkemikalier, der ikke er opløselige i denne koncentration, kan imidlertid stadig testes ved lavere opløselige koncentrationer. I så fald vil et positivt resultat stadig kunne anvendes til at understøtte bestemmelsen af testkemikaliets hudsensibiliserende, men et negativt resultat bør ikke føre til nogen endelig konklusion om manglende reaktivitet. I øjeblikket er der begrænsede oplysninger tilgængelige om anvendeligheden af DPRA til blandinger med kendt sammensætning (18) (19). DPRA betragtes alligevel som teknisk anvendelig til test af stoffer med flere bestanddele og blandinger med kendt sammensætning (se punkt 18). Før brug af denne forsøgsmetode til lovmæssig test af en blanding til generering af data bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen. Den nuværende forudsigelsesmodel kan ikke anvendes til komplekse blandinger af ukendt sammensætning eller til stoffer med ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer (dvs. UVCB-stoffer) på grund af de definerede molforhold for testkemikalie og peptid. Der vil derfor skulle udvikles en ny forudsigelsesmodel til dette baseret på en gravimetrisk metode. I de tilfælde, hvor det kan påvises, at forsøgsmetoden ikke er anvendelig til andre specifikke kategorier af kemikalier, bør forsøgsmetoden ikke anvendes til de pågældende kategorier.

Denne forsøgsmetode er en *in chemico*-metode, der ikke omfatter et metabolisk system. Kemikalier, der kræver enzymatisk bioaktivering for at udøve deres hudsensibiliseringspotentiale (dvs. pro-haptener), kan ikke spores med denne forsøgsmetode. Der findes rapporter om, at kemikalier, der bliver til sensibiliserende stoffer efter abiotisk omdannelse (dvs. præ-haptener), i nogle tilfælde kan spores korrekt med denne forsøgsmetode (18). I lyset af ovenstående bør negative resultater, der er opnået med forsøgsmetoden, fortolkes i lyset af de anførte begrænsninger og i kombination med andre informationskilder inden for rammerne af en IATA. Testkemikalier, der ikke bindes kovalent til peptidet, men fremmer dets oxidering (dvs. cysteindimerisering), kan medføre en overvurdering af peptidnedbrydningen, hvilket kan resultere i mulige falsk positive forudsigelser og/eller placering i en højere reaktivitetsklasse (jf. punkt 29 og 30).

Som beskrevet understøtter DPRA sontring mellem hudsensibiliserende og ikke-hudsensibiliserende stoffer. Det kan imidlertid også bidrage til vurderingen af sensibiliseringsstyrken (11), når det bruges i integrerede tilgange såsom IATA. Der er dog behov for yderligere arbejde, fortrinsvis baseret på data for mennesker, for at fastslå, hvordan DPRA-resultaterne kan anvendes til styrkevurderingen.

PRINCIP FOR TESTEN

DPRA er en *in chemico*-metode, der kvantificerer restkoncentrationen af cystein- eller lysin-holdigt peptid efter 24 timers inkubering med testkemikaliets ved $25 \pm 2,5$ °C. Den syntetiske peptid indeholder phenylalanin for at hjælpe med påvisningen. Den relative peptidkoncentration måles ved højtryksvæskeskromatografi (HPLC) med gradienteluering og UV-detektion ved 220 nm. Herefter beregnes nedbrydningsværdierne for det cystein- og lysinholdige peptid i procent og anvendes i en forudsigelsesmodel (se punkt 29), som gør det muligt at placere testkemikaliets i en af fire reaktivitetsklasser, der anvendes som grundlag for sontringen mellem sensibiliserende stoffer og ikke-sensibiliserende stoffer.

Før rutinemæssig brug af den metode, der beskrives i denne forsøgsmetode, bør laboratorierne godtgøre deres tekniske kompetence ved hjælp af de 10 kompetencestoffer, der findes opført i tillæg 2.

FREM GANGSMÅDE

Denne forsøgsmetode er baseret på DPRA DB-ALM protokol nr. 154 (20), der repræsenterer den protokol, der blev anvendt i valideringsundersøgelsen koordineret af EURL ECVAM. Det anbefales, at denne protokol anvendes, når metoden indføres og anvendes i laboratoriet. Følgende er en beskrivelse af de vigtigste DPRA-komponenter og procedurer. Hvis der anvendes en alternativ HPLC-opstilling, bør dens ækvivalens med den validerede opstilling, som beskrives i DB-ALM-protokollen, dokumenteres (f.eks. ved at teste kompetencestofferne i tillæg 2).

Præparering af de cystein- eller lysinholdige peptider

Stamopløsninger af cystein (Ac-RFAACAA-COOH) og lysin (Ac-RFAAKAA-COOH), der indeholder syntetiske peptider med en renhed på over 85 % og helst i intervallet 90-95 %, fremstilles lige før deres inkubering med testkemikaliets. Slutkoncentrationen af cysteinpeptidet bør være 0,667 mM i pH 7,5-fosfatbuffer, mens slutkoncentrationen af lysinpeptid bør være 0,667 mM i pH 10,2-ammoniumacetatbuffer. HPLC-analysesekvensen bør fastlægges med henblik på at holde varigheden af HPLC-analysen under 30 timer. Til den HPLC-opstilling, som blev anvendt i valideringsundersøgelsen og beskrives i denne forsøgsmetode, kan op til 26 analyseprøver (der omfatter testkemikaliets, den positive kontrol og et hensigtsmæssigt antal opløsningsmiddelkontroller på grundlag af antallet af individuelle opløsningsmidler, der anvendes i testen, som hvert afprøves i tre eksemplarer), medtages i en enkelt HPLC-kørsel. Til alle replikater, som analyseres i samme kørsel, bør der anvendes identiske stamopløsninger af cystein- og lysinpeptid. Det anbefales at kontrollere, at de enkelte peptidbatches har korrekt opløselighed, inden de bruges.

Præparering af testkemikaliets

Teststoffets opløselighed i et passende opløsningsmiddel bør vurderes, inden assayet gennemføres, i henhold til opløselighedsproceduren, der beskrives i DPRA DB-ALM-protokollen (20). Et passende opløsningsmiddel vil opløse testkemikaliets helt. Eftersom en stor overskydende mængde af DPRA-testkemikaliets inkuberes i enten cystein- eller lysinpeptiderne, betragtes visuel kontrol af dannelsen af en klar opløsning for at være tilstrækkelig til at fastslå, at testkemikaliets (og alle dets komponenter i forbindelse med afprøvning af et stof med flere bestanddele eller en blanding) er opløst. Egnede opløsningsmidler er acetonitril, vand, en 1:1-blanding af vand og acetonitril, isopropanol, acetone eller en 1:1-blanding af acetone og acetonitril. Andre opløsningsmidler kan anvendes, så længe de ikke påvirker stabiliteten af peptidet, som overvåges med referencekontrol C (dvs. prøver bestående af peptid alene opløst i et passende opløsningsmiddel, jf. tillæg 3). Som en sidste mulighed, hvis testkemikaliets ikke er opløseligt i nogen af disse opløsningsmidler, må det forsøges at opløse det i 300 µl DMSO og fortynde den fremkomne opløsning med 2 700 µl acetonitril. Hvis testkemikaliets ikke er opløseligt i denne blanding, må det forsøges at opløse den samme mængde af testkemikaliets i 1 500 µl DMSO og fortynde den fremkomne opløsning med 1 500 µl acetonitril. Testkemikaliets bør afvejes på forhånd i hætteglas og opløses lige inden testen i et egnet opløsningsmiddel, så der fremstilles en 100 mM-opløsning. For blandinger og stoffer med flere bestanddele med kendt sammensætning bør en enkelt renhed bestemmes af summen af andelen af bestanddelene (undtagen vand), og en enkelt tilsyneladende molekylvægt bør bestemmes på grundlag af de enkelte molekylvægte af de enkelte bestanddele i blandingen (undtagen vand) og deres individuelle andele. Den resulterende renhed og tilsyneladende molekylvægt bør derefter bruges til at beregne den mængde testkemikalie, som skal bruges for fremstille en 100 mM-opløsning. For polymerer, for hvilke det ikke er muligt at fastslå en primær molekylvægt, kan molekylvægten af monomeren (eller den tilsyneladende molekylvægt af de forskellige monomere, der udgør polymeren) anvendes til at fremstille en 100 mM-opløsning. Men ved test af blandinger, stoffer med flere bestanddele eller polymerer med kendt sammensætning bør det overvejes også at teste det rene kemikalie. For væsker bør det rene kemikalie testes uden forudgående fortynding ved at inkubere det med cystein- og lysinpeptiderne i et molforhold på henholdsvis 1:10 og 1:50. For faste stoffer bør teststoffet opløses til sin maksimale opløselige koncentration i samme opløsningsmiddel, som bruges til at fremstille den tilsyneladende 100 mM-opløsning. For væsker bør det rene kemikalie testes uden forudgående fortynding ved at inkubere det med cystein- og lysinpeptiderne i et molforhold på henholdsvis 1:10 og 1:50. Enslydende resultater (reaktive eller ikke-reaktive) mellem den tilsyneladende 100 mM-opløsning og det rene kemikalie bør give mulighed for at udlede en entydig konklusion om resultatet.

Forberedelse af den positive kontrol, referencekontroller og co-elueringskontroller

Kanelaldehyd (CAS 104-55-2, ≥ 95 % fødevarer godkendt renhed) bør anvendes som positiv kontrol i en koncentration på 100 mM i acetonitril. Andre egnede positive kontroller, helst med nedbrydningsværdier i mellemområdet, kan anvendes, hvis der foreligger historiske data, som kan anvendes til at udlede sammenlignelige acceptkriterier for kørslen. Desuden bør man også medtage referencekontroller (dvs. prøver, der kun indeholder peptidet opløst i et passende opløsningsmiddel) i HPLC-analysesekvensen, og disse benyttes til at kontrollere HPLC-systemets egnethed forud for analysen (referencekontrol A), stabiliteten af referencekontrollerne over tid (referencekontrol B) og til at kontrollere, at det opløsningsmiddel, der anvendes til at opløse testkemikallet, ikke påvirker den procentvise peptidnedbrydning (referencekontrol C) (jf. tillæg 3). Den relevante referencekontrol for hvert kemikalie bruges til at beregne den procentvise peptidnedbrydning for det pågældende kemikalie (se punkt 26). Desuden bør man medtage en co-elueringskontrol, som udelukkende består af testkemikallet, i analyseserien med henblik på at konstatere mulig co-eluering af testkemikallet med enten lysin- eller cysteinpeptidet.

Inkubering af testkemikallet med cystein- og lysinpeptidopløsningerne

Cystein- og lysinpeptidopløsninger bør inkuberes i autosampler-hætteglas med testkemikallet i et forhold på henholdsvis 1:10 og 1:50. Hvis der observeres bundfald umiddelbart efter tilsætning af testkemikalieopløsningen til peptidopløsningen på grund af testkemikallets lave vandopløselighed, kan man ikke være sikker på, hvor meget af testkemikallet, der forblev i opløsningen til at reagere med peptidet. Derfor kan man i sådanne tilfælde stadig bruge et positivt resultat, men et negativt resultat er usikkert og bør fortolkes med behørig forsigtighed (se også bestemmelserne i punkt 11 vedrørende test af kemikalier, der ikke er opløselige op til en koncentration på 100 mM). Reaktionsopløsningen bør stå i mørke ved $25 \pm 2,5$ °C i 24 ± 2 timer, før HPLC-analysen foretages. Hvert testkemikalie bør analyseres i tre eksemplarer for begge peptider. Prøverne skal undersøges visuelt forud for HPLC-analysen. Hvis der observeres bundfald eller faseadskillelse, kan prøverne centrifugeres ved lav hastighed ($100-400 \times g$) for at tvinge bundfald til bunden af hætteglasset som en sikkerhedsforanstaltning, da store mængder bundfald kan tilstoppe HPLC-rør og -kolonner. Hvis der observeres bundfald eller faseadskillelse efter inkubationsperioden, kan peptidnedbrydningen være undervurderet, og man kan ikke udlede en konklusion om den manglende reaktivitet med tilstrækkelig sikkerhed i tilfælde af et negativt resultat.

Udarbejdelse af standardkalibreringskurven for HPLC

Der bør genereres en kalibreringskurve for både cystein- og lysinpeptiderne. Peptidstandarder præpareres i en opløsning med 20 % eller 25 % acetonitrilbuffer i forhold til buffer, idet der anvendes fosfatbuffer (pH 7,5) til cysteinpeptidet og ammoniumacetatbuffer (pH 10,2) til lysinpeptidet. Under anvendelse af serielle fortyndingsstandarder for peptidstamopløsningen (0,667 mM) fremstilles der seks kalibreringsopløsninger, der dækker området fra 0,534 til 0,0167 mM. En blindprøve af fortyndingsbufferen bør også medtages i standardkalibreringskurven. Passende kalibreringskurver skal have en $r^2 > 0,99$.

Forberedelse af HPLC og analyse

HPLC-systemets egnethed skal kontrolleres forud for analysen. Peptidnedbrydningen overvåges af HPLC kombineret med en UV-detektor (fotodiodearraydetektor eller absorptionsdetektor med fast bølgelængde med 220 nm-signal). Den relevante kolonne installeres i HPLC-systemet. Den HPLC-opstilling, der er beskrevet i den validerede protokol, består af en Zorbax SB-C-18 2,1 mm $\times$ 100 mm $\times$ 3,5 μ m som foretrukket kolonne. Med denne HPLC-kolonne

med omvendt fase bør hele systemet bringes i ligevægt ved 30 °C med 50 % fase A (0,1 % (v/v) trifluoreddikesyre i vand) og 50 % fase B (0,085 % (v/v) trifluoreddikesyre i acetonitril) i mindst 2 timer før kørsel. HPLC-analysen bør udføres ved en flowhastighed på 0,35 ml/min. og en lineær gradient fra 10 % til 25 % acetonitril i 10 minutter efterfulgt af en hurtig stigning til 90 % acetonitril for at fjerne andre materialer. Der bør indsprøjtes lige store mængder af hver enkelt standard, prøve og kontrol. Kolonnen bør bringes i ligevægt igen under de oprindelige forhold i 7 minutter mellem injektionerne. Hvis der anvendes en anden HPLC-kolonne med omvendt fase, kan det være nødvendigt at justere de indstillingsparametre, der er beskrevet ovenfor, for at sikre en passende eluering og integration af cystein- og lysinpeptiderne, herunder injektionsvolumen, der kan variere alt efter det anvendte system (typisk i størrelsesordenen 3-10 µl). Hvis der anvendes en alternativ HPLC-opstilling, er det vigtigt at dokumentere dens ækvivalens med den validerede opsætning, som er beskrevet ovenfor (f.eks. ved at teste kompetencestofferne i tillæg 2). Absorbans måles ved 220 nm. Hvis en fotodiodearraydetektor anvendes, registreres absorbansen ved 258 nm ligeledes. Det skal bemærkes, at nogle leverancer af acetonitril kan have en negativ indvirkning på peptidstabiliteten, og dette skal vurderes, når der anvendes et nyt batch acetonitril. Forholdet mellem toparealet ved 220 nm og toparealet ved 258 nm kan bruges som indikator for co-elueringen. For hver prøve vil et forhold i området 90 % < gennemsnitligt ⁽¹⁾ områdeforhold for kontrolprøver < 100 % være en god indikation af, at co-elueringen ikke har fundet sted.

Der kan være testkemikalier, som kan fremme oxideringen af cysteinpeptidet. Topniveauet for det dimeriserede cysteinpeptid kan kontrolleres visuelt. Hvis dimeriseringen tilsyneladende er indtruffet, bør dette noteres, eftersom den procentvise peptidnedbrydning kan overvurderes, hvilket kan føre til falsk positive forudsigelser og/eller placering i en højere reaktivitetsklasse (jf. punkt 29 og 30).

HPLC-analyse af cystein- og lysinpeptider kan udføres samtidig (hvis der er to HPLC-systemer til rådighed) eller på forskellige dage. Hvis analysen udføres på forskellige dage, bør alle kemiske opløsninger fremstilles for begge assays på hver af disse dage. Tidspunktet for analysen vælges således, at injektionen af den første prøve indledes 22-26 timer efter, at testkemikallet blev blandet med peptidopløsningen. HPLC-analysesekvensen bør fastlægges med henblik på at holde varigheden af HPLC-analysen under 30 timer. Til den HPLC-opstilling, der blev brugt i valideringsundersøgelsen, og som beskrives i denne forsøgsmetode, kan der medtages op til 26 analyseprøver i en enkelt HPLC-kørsel (se også punkt 17). Tillæg 3 indeholder et eksempel på HPLC-analysesekvensen.

DATA OG RAPPORTERING

Dataevaluering

Koncentrationen af cystein- eller lysinpeptidet bestemmes fotometrisk ved 220 nm i hver prøve ved at måle toparealet (areal under kurven, AUC) for de relevante toppe og ved at beregne peptidkoncentrationen ved hjælp af den lineære kalibreringskurve, som er afledt af disse standarder.

Den procentvise peptidnedbrydning bestemmes i hver prøve ved at måle toparealet og dividere det med det gennemsnitlige topareal for de relevante referencekontroller C (se tillæg 3) i henhold til nedenstående formel.

$$\text{Peptidnedbrydning} = \left[1 - \left(\frac{\text{Peptidtopareal i replikat injektion}}{\text{Gnsn. peptidtopareal i referencekontroller C}} \right) \right] \times 100$$

Acceptkriterier

Følgende kriterier bør være opfyldt, for at en kørsel kan anses for gyldig:

- Standardkalibreringskurven bør have en $r^2 > 0,99$.

⁽¹⁾ Med gennemsnitlig menes det matematiske gennemsnit i hele dokumentet.

- b) Den gennemsnitlige peptidnedbrydningsværdi i procent for de tre replikater for kanelaldehyden til den positive kontrol bør være mellem 60,8 % og 100 % for cysteinpeptidet og mellem 40,2 % og 69,0 % for lysinpeptidet, og den maksimale standardafvigelse for de positive kontrolreplikater bør være < 14,9 % for den procentvise cysteinnedbrydning og < 11,6 % for den procentvise lysinnedbrydning.
- c) Den gennemsnitlige peptidkoncentration for referencekontrol A bør være $0,5 \pm 0,05$ mM og variationskoefficienten for peptidernes toparealer for de ni referencekontroller B og C i acetonitril bør være < 15,0 %.

Hvis et eller flere af disse kriterier ikke er opfyldt, bør kørslen gentages.

Følgende kriterier bør være opfyldt, hvis testresultatet for kemikaliet skal anses for gyldigt:

- a) Den maksimale standardafvigelse for replikaterne af testkemikaliet bør være < 14,9 % for den procentvise cysteinnedbrydning og < 11,6 % for den procentvise lysinnedbrydning.
- b) Den gennemsnitlige peptidkoncentration af de tre referencekontroller C i det relevante opløsningsmiddel bør være $0,50 \pm 0,05$ mM. Hvis disse kriterier ikke er opfyldt, bør dataene afvises og kørslen gentages for det pågældende testkemikalie.

Forudsigelsesmodel

Den gennemsnitlige procentvise cystein- og lysinnedbrydningsværdi i procent beregnes for hvert enkelt testkemikalie. Negativ nedbrydning betragtes som "0" ved beregning af middelværdien. Ved brug af cystein 1:10-/lysin 1:50-forudsigelsesmodellen i tabel 1 bør grænsen på 6,38 % for den gennemsnitlige peptidnedbrydning anvendes til at underbygge sondringen mellem hudsensibiliserende og ikke-hudsensibiliserende stoffer inden for rammerne af en IATA. Det kan måske være nyttigt at anvende forudsigelsesmodellen til at placere et testkemikalie i en reaktivitetsklasse (dvs. lav, moderat og høj reaktivitet) som grundlag for styrkevurderingen inden for rammerne af en IATA.

Tabel 1

Cystein 1:10/lysin 1:50-forudsigelsesmodel ⁽¹⁾

Middelværdi for procentvis cystein- og lysinnedbrydning	Reaktivitetsklasse	DPRA-forudsigelse ⁽²⁾
0 % < middelværdi for procentvis nedbrydning ≤ 6,38 %	Ingen eller minimal reaktivitet	Negativ
6,38 % < middelværdi for procentvis nedbrydning ≤ 22,62 %	Lav reaktivitet	Positiv
22,62 % < middelværdi for procentvis nedbrydning ≤ 42,47 %	Moderat reaktivitet	
42,47 % < middelværdi for procentvis nedbrydning ≤ 100 %	Høj reaktivitet	

⁽¹⁾ Tallene henviser til statistisk genererede tærskelværdier og er ikke forbundet med nøjagtigheden af målingen.

⁽²⁾ Man kan overveje en DPRA-forudsigelse inden for rammerne af en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 9 og 12.

Der kan være tilfælde, hvor testkemikaliet (stoffet eller en eller flere bestanddele af et stof eller en blanding) absorberer betydeligt ved 220 nm og har samme retentionstid for peptidet (co-eluering). Co-eluering kan afhjælpes ved at justere HPLC-opstillingen smule med henblik på at adskille elueringstiden for testkemikaliet og peptidet yderligere. Hvis der anvendes en alternativ HPLC-opstilling for at forsøge at afhjælpe co-elueringen, bør man dokumentere dens ækvivalens med den validerede opstilling (f.eks. ved at teste kompetencestofferne i tillæg 2). Når co-eluering forekommer, kan topområdet for peptidet ikke kan integreres, og det er ikke muligt at beregne den procentvise nedbrydning af peptidet. Hvis co-eluering af sådanne testkemikalier forekommer i forbindelse med både cystein- og lysinpeptider, bør analysen rapporteres som "usikker". I tilfælde, hvor co-eluering kun forekommer med lysinpeptidet, kan cystein 1:10-modellen, som er beskrevet i tabel 2, anvendes.

Tabel 2

Cystein 1:10-forudsigelsesmodel ⁽¹⁾

Procentvis cystein- (Cys) nedbrydning	Reaktivitetsklasse	DPRA-forudsigelse ⁽²⁾
0 % ≤ procentvis Cys-nedbrydning ≤ 13,89 %	Ingen eller minimal reaktivitet	Negativ
13,89 % < procentvis Cys-nedbrydning ≤ 23,09 %	Lav reaktivitet	Positiv
23,09 % < procentvis Cys-nedbrydning ≤ 98,24 %	Moderat reaktivitet	
98,24 % < procentvis Cys-nedbrydning ≤ 100 %	Høj reaktivitet	

⁽¹⁾ Tallene henviser til statistisk genererede tærskelværdier og er ikke forbundet med nøjagtigheden af målingen.

⁽²⁾ Man kan overveje en DPRA-forudsigelse inden for rammerne af en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 9 og 12.

Der kan være andre tilfælde, hvor overlapet i retentionstid mellem testkemikaliet og de to peptider er ufuldstændig. I sådanne tilfælde kan man vurdere de procentvise peptidnedbrydningsværdier og anvende dem i cystein 1:10-/lysin 1:50-modellen, men det er imidlertid ikke muligt at foretage en præcis placering af testkemikaliet i en reaktivitetsklasse.

En enkelt HPLC-analyse for både cystein- og lysinpeptidet bør være tilstrækkelig for et testkemikalie, når resultatet er entydigt. Men i tilfælde af resultater, der ligger tæt på den tærskelværdi, der bruges til at skelne mellem positive og negative resultater (dvs. usikre resultater), kan der være behov for yderligere undersøgelser. Hvis situationer, hvor den gennemsnitlige procentvise nedbrydning ligger i området 3 % til 10 % for cystein 1:10-/lysin 1:50-forudsigelsesmodellen, eller den procentvise cystein nedbrydning ligger i området 9 %-17 % for cystein 1:10-forudsigelsesmodellen, bør man overveje endnu en kørsel og en tredje kørsel, hvis de to første kørsler giver modstridende resultater.

Testrapport

Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger

Testkemikalie

— Stof med kun en bestanddel

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

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

Kontroller

- positiv kontrol
 - kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer
 - fysisk udseende, vandopløselighed, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt
 - renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.
 - eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)
 - testede koncentrationer
 - opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt
 - reference til historiske positive kontrolresultater, der udviser passende acceptkriterier for kørsel, hvis det er relevant.
- Opløsningsmiddel/bærestof
 - anvendt opløsningsmiddel/bærestof og forholdet mellem dets bestanddele, hvis det er relevant
 - kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre og/eller andre identifikatorer
 - renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.
 - fysisk udseende, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber ved brug af andre opløsningsmidler/bærestoffer end dem, der er nævnt i forsøgsmetoden, i det omfang, det er muligt
 - opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt

- begrundelse for valg af opløsningsmiddel for de enkelte testkemikalier
- for acetonitril testresultater for indvirkningen på peptidstabilitet.

Præparering af peptider, positiv kontrol og testkemikalie

- karakterisering af peptidopløsninger (leverandør, parti, nøjagtig vægt af peptidet, tilsat mængde til stamopløsning)
- karakterisering af den positive kontrolopløsning (nøjagtig vægt af det positive kontrolstof, tilsat mængde til testopløsningen)
- karakterisering af opløsninger af testkemikallet (nøjagtig vægt af testkemikallet, tilsat mængde til testopløsningen).

Indstilling af HPLC-instrument og analyse

- type af HPLC-instrument, HPLC- og forkolonner, detektor, autosampler
- relevante parametre for HPLC-analysen såsom kolonnetemperatur, injektionsmængder, flow og gradient.

Systemets egnethed

- topareal for peptid ved 220 nm for hver standard- og referencekontrol A-replikat
- grafisk gengivelse af lineær kalibreringskurve og den indbittede r^2
- peptidkoncentrationen for hvert referencekontrol A-replikat
- gennemsnitlig peptidkoncentration (mM) i de tre referencekontroller A, SD og CV
- peptidkoncentrationen for referencekontrollerne A og C.

Analysesekvens

- For referencekontroller:
 - topareal for peptid ved 220 nm for hvert B- og C-replikat
 - gennemsnitligt topareal for peptid ved 220 nm for de ni referencekontroller B og C i acetonitril, standardafvigelse og variationskoefficient (af hensyn til stabiliteten af referencekontrollerne i analyseperioden)
 - for hvert anvendt opløsningsmiddel toparealet for peptidet ved 220 nm for de tre relevante referencekontroller C (til beregning af den procentvise peptidnedbrydning)
 - for hvert anvendt opløsningsmiddel peptidkoncentrationen (mM) for de tre relevante referencekontroller C
 - for hvert anvendt opløsningsmiddel den gennemsnitlige peptidkoncentration (mM) for de tre relevante referencekontroller C, standardafvigelse og variationskoefficient.
- For positiv kontrol:
 - topareal for peptid ved 220 nm for hvert replikat
 - procentvis peptidnedbrydning for hvert replikat
 - gennemsnitlig peptidnedbrydning for de tre replikater, standardafvigelse og variationskoefficient.
- For hvert testkemikalie:
 - eventuel forekomst af bundfald i reaktionsblandingen ved afslutningen af inkubationstiden; om bundfaldet blev genopløst eller centrifugeret

- forekomst af co-eluering
- beskrivelse af eventuelle andre relevante observationer, hvis det er relevant
- topareal for peptid ved 220 nm for hvert replikat
- procentvis peptidnedbrydning for hvert replikat
- gennemsnitlig peptidnedbrydning for de tre replikater, standardafvigelse og variationskoefficient
- gennemsnitlige procentvise nedbrydningsværdier for cystein og lysin
- anvendt forudsigelsesmodel og DPRA-forudsigelser.

Kompetencetest

- hvis det er relevant, den procedure, der anvendes til at påvise laboratoriets kompetence til at anvende forsøgsmetoden (f.eks. ved test af kompetencestoffer) eller til at påvise reproducerbare resultater af forsøgsmetoden over tid.

Diskussion af resultaterne

- diskussion af de resultater, der er opnået med DPRA-forsøgsmetoden
- diskussion af forsøgsmetodens resultater i forbindelse med en IATA, hvis der foreligger andre relevante oplysninger.

Konklusion

LITTERATUR

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Tilgængelig på: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_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, OECD, Paris.
- (3) Kapitel B.6 i dette bilag: Hudsensibilisering.
- (4) Kapitel B.42 i dette bilag: Assay på lokale lymfeknuder:
- (5) Kapitel B.50 i dette bilag: Hudsensibilisering: Assay på lokale lymfeknuder: DA.
- (6) Kapitel B.51 i dette bilag: Hudsensibilisering: Assay på lokale lymfeknuder BrdU-ELISA
- (7) Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85:367-485.
- (8) Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81:332-343.
- (9) Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97:417-427.
- (10) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Tilgængelig på: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra>
- (11) Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, published online, 14 May 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

-
- (12) Bauch *et al.* (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 63: 489-504.
- (13) Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. *Toxicology in vitro* 27:609-618.
- (14) Ball *et al.* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 60:389-400.
- (15) Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *Journal of Experimental Medicine* 64:625-639.
- (16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.
- (17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.
- (18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74pp. Tilgængelig på: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra
- (19) Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, published online, 9 April 2013, DOI:10.1002/jat.2868.
- (20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Tilgængelig på: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (21) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- (22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Tilgængelig på: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf — 138
- (23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
-

Tillæg 1

DEFINITIONER

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

AOP (Adverse Outcome Pathway): Sekvens af begivenheder fra den kemiske struktur af et målkemikalie eller en gruppe af ensartede kemikalier gennem den molekulære udløsende begivenhed til et in vivo-resultat af interesse (2).

Kalibreringskurve: Forholdet mellem den eksperimentelle responsværdi og den analytiske koncentration (også kaldet standardkurve) for et kendt stof.

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

Variationskoefficient: Et mål for variation, der beregnes for en gruppe af replikationsdata ved at dividere standardafvigelsen med middelværdien. Den kan ganges med 100 for at opnå en procentsats.

Fare: Den iboende egenskab ved et middel eller en situation, som kan forårsage skade, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende middel.

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

Molekylær udløsende begivenhed: Kemikalieinduceret forstyrrelse af et biologisk system på molekylært niveau, der identificeres som startbegivenheden i AOP.

Blanding: En blanding eller opløsning, der er sammensat af to eller flere stoffer, hvori de ikke reagerer (1).

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

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

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

Referencekontrol: En ubehandlet prøve, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem, herunder opløsningsmidlet eller bærestoffet, og som behandles sammen med de testkemikaliebehandlede prøver og andre kontrolprøver for at fastlægge basisresponsen for de prøver, som er behandlet med testkemikalien opløst i det samme opløsningsmiddel eller bærestof. Når denne prøve testes med en samtidig negativ kontrol, viser den også, hvorvidt opløsningsmidlet eller bærestoffet interagerer med testsystemet.

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

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

Reproducerbarhed: Overensstemmelse mellem resultater af test af samme kemikalie med samme testprotokol (21).

Følsomhed: Andelen af alle positive/aktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved forsøgsmetoden. Det er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (21).

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

Stof: Grundstoffer og forbindelser heraf, naturlige eller industrielt fremstillede, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, som kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning (1).

Systemets egnethed: Bestemmelse af instrumentets funktionsdygtighed (f.eks. følsomhed) ved analyse af en referencestandard, før analyse-batchen køres (22).

Testkemikalie: Betegnelsen »testkemikalie« henviser til det, der bliver testet.

De Forenede Nationers globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals — UN GHS): Et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, risikosætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikalernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljø (1).

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

Gyldig forsøgsmetode: En forsøgsmetode, der anses for at være tilstrækkeligt relevant og pålidelig til et bestemt formål, og som er baseret på videnskabeligt forsvarlige principper. En forsøgsmetode har aldrig absolut gyldighed, men kun i forbindelse med et bestemt formål (21).

Tillæg 2

KOMPETENCESTOFFER

In chemico-hudsensibilisering: Direkte peptidreaktivitetsassay (DPRA)

Før rutinemæssig brug af denne forsøgsmetode, bør laboratorierne godtgøre deres tekniske kompetence ved at opnå den forventede DPRA-forudsigelse på korrekt vis for de 10 kompetencestoffer, der anbefales i tabel 1, og ved at opnå cystein- og lysin-nedbrydningsværdier, der falder ind under de respektive referenceområder for 8 ud af de 10 kompetencestoffer for hvert peptid. Disse kompetencestoffer er udvalgt således, at de repræsenterer responsområdet for hudsensibiliseringsfare. Andre udvælgelseskriterier er, at stofferne er kommercielt tilgængelige, at der foreligger in vivo-referencedata af høj kvalitet og in vitro-data af høj kvalitet, der er genereret med DPRA, og at de blev anvendt i den EURL ECVAM-koordinerede valideringsundersøgelse til at påvise en vellykket gennemførelse af forsøgsmetoden i de laboratorier, der deltog i undersøgelsen.

Tabel 1

Anbefalede kompetencestoffer til dokumentation af teknisk kompetence i det direkte peptidreaktivitetsassay

Kompetencestoffer	CASRN	Fysisk form	In vivo-forudsigelse ⁽¹⁾	DPRA-forudsigelse ⁽²⁾	Interval ⁽³⁾ af procentvis cysteinpeptid-nedbrydning	Interval ⁽³⁾ af procentvis lysinpeptid-nedbrydning
2,4-dinitrochlorbenzen	97-00-7	Fast	Sensibiliserende stof (ekstrem)	Positiv	90-100	15-45
Oxazolone	15646-46-5	Fast	Sensibiliserende stof (ekstrem)	Positiv	60-80	10-55
Formaldehyd	50-00-0	Flydende	Sensibiliserende stof (stærk)	Positiv	30-60	0-24
Benzylidenacetone	122-57-6	Fast	Sensibiliserende stof (moderat)	Positiv	80-100	0-7
Farnesal	19317-11-4	Flydende	Sensibiliserende stof (svag)	Positiv	15-55	0-25
2,3-butanedion	431-03-8	Flydende	Sensibiliserende stof (svag)	Positiv	60-100	10-45
1-butanol	71-36-3	Flydende	Ikke-sensibiliserende stof	Negativ	0-7	0-5,5
6-methylcoumarin	92-48-8	Fast	Ikke-sensibiliserende stof	Negativ	0-7	0-5,5

Kompetencestoffer	CASRN	Fysisk form	In vivo-forudsigelse ⁽¹⁾	DPRA-forudsigelse ⁽²⁾	Interval ⁽³⁾ af procentvis cysteinpeptid-nedbrydning	Interval ⁽³⁾ af procentvis lysinpeptid-nedbrydning
Mælkesyre	50-21-5	Flydende	Ikke-sensibiliserende stof	Negativ	0-7	0-5,5
4-methoxyacetophenon	100-06-1	Fast	Ikke-sensibiliserende stof	Negativ	0-7	0-5,5

⁽¹⁾ Forudsigelser for in vivo-fare og (styrke) er baseret på LLNA-data (19). In vivo-styrken er beregnet ud fra de kriterier, der foreslås af ECETOC (23).

⁽²⁾ Man kan overveje en DPRA-forudsigelse inden for rammerne af en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 9 og 11.

⁽³⁾ Intervallerne fastlægges på grundlag af mindst 10 nedbrydningsværdier, som genereres af seks uafhængige laboratorier.

Tillæg 3

EKSEMPLER PÅ ANALYSESEKVENSER

Kalibreringsstandarder og referencekontroller	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Fortyndingsbuffer Referencekontrol A, rep 1 Referencekontrol A, rep 2 Referencekontrol A, rep 3
Co-elueringskontroller	Co-elueringskontrol 1 for testkemikalie 1 Co-elueringskontrol 2 for testkemikalie 2
Referencekontroller	Referencekontrol B, rep 1 Referencekontrol B, rep 2 Referencekontrol B, rep 3
Første sæt replikater	Referencekontrol C, rep 1 Kanelaldehyd, rep 1 Prøve 1, rep 1 Prøve 2, rep 1
Andet sæt replikater	Referencekontrol C, rep 2 Kanelaldehyd, rep 2 Prøve 1, rep 2 Prøve 2, rep 2
Tredje sæt replikater	Referencekontrol C, rep 3 Kanelaldehyd, rep 3 Prøve 1, rep 3 Prøve 2, rep 3
Referencekontroller	Referencekontrol B, rep 4 Referencekontrol B, rep 5 Referencekontrol B, rep 6

Tre sæt referencekontroller (dvs. prøver, som udelukkende består af peptidet opløst i et passende opløsningsmiddel) bør indgå i analysesekvensen:

Referencekontrol A: anvendes til at kontrollere HPLC-systemets egnethed.

Referencekontrol B: indgår i begyndelsen og slutningen af analysesekvensen for at kontrollere stabiliteten af referencekontrollerne i løbet af analysen.

Referencekontrol C: indgår i analysesekvensen for at kontrollere, at det opløsningsmiddel, der anvendes til at opløse testkemikalien, ikke påvirker den procentvise peptidnedbrydning.

B.60 In vitro-hudsensibilisering: ARE-Nrf2-luciferase-forsøgsmetoden

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline (TG)) 442D (2015). Et hudsensibiliserende stof er et stof, der fremkalder en allergisk reaktion ved hudkontakt som defineret ved De Forenede Nationers globalt harmoniserede system til klassificering og mærkning af kemikalier (UN GHS) (1) og forordning (EF) nr. 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP-forordningen) ⁽¹⁾. Denne forsøgsmetode indeholder en in vitro-procedure (ARE-Nrf2-luciferase-assayet), der anvendes til at underbygge sondringen mellem hudsensibiliserende og ikke-hudsensibiliserende stoffer i henhold til FN's GHS (1) og CLP.

Der hersker almindelig enighed om de centrale biologiske begivenheder, som ligger til grund for hudsensibilisering. Den nuværende viden om kemiske og biologiske mekanismer i forbindelse med hudsensibilisering er sammenfattet i form af en Adverse Outcome Pathway (AOP) (2), fra den molekulære udløsende begivenhed gennem de mellemliggende begivenheder til den skadelige sundhedsvirkning, dvs. allergisk kontaktdermatitis hos mennesker eller kontaktoverfølsomhed hos gnavere (2) (3). Den molekulære udløsende begivenhed er den kovalente binding af elektrofile stoffer til nukleofile centre i hudproteiner. Den anden centrale begivenhed i denne AOP finder sted i keratinocytter og omfatter inflammatoriske reaktioner samt genekspression forbundet med specifikke cellesignalveje, f.eks. antioxidant-/elektrofilrespons-element- (ARE) afhængige veje. Den tredje centrale begivenhed er aktivering af dendritiske celler, som typisk vurderes ved ekspression af bestemte celleoverflademarkører, kemokiner og cytokiner. Den fjerde centrale begivenhed er T-celleproliferation, som vurderes indirekte ved assayet på lokale lymfeknuder i mus (4).

Vurderingen af hudsensibilisering har typisk omfattet brug af laboratoriedyr. Med de klassiske metoder baseret på marsvin, Guinea Pig Maximisation Test (GPMT) og Buehler-testen (TM B.6 (5)) undersøger man både induktions- og udløsningsfasen ved hudsensibilisering. En musetest, assayet på lokale lymfeknuder (LLNA, TM B.42 (4)), og dens to ikke-radioaktive ændringer, LLNA: DA (TM B.50 (6)) og LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (7)), som alle udelukkende vurderer induktionsresponsen, er også blevet accepteret, eftersom de indebærer en fordel i forhold til marsvinetest både, hvad angår dyrevelfærd og objektiv måling af induktionsfasen for hudsensibilisering.

På det seneste har man anset mekanistisk baserede in chemico- og in vitro-forsøgsmetoder for videnskabeligt valide til evaluering af kemikaliers hudsensibiliseringsfare. Men der vil være behov for kombinationer af metoder uden brug af dyr (in silico, in chemico, in vitro) inden for integrerede tilgange til afprøvning og vurdering (IATA) for fuldt ud at kunne erstatte de dyreforsøg, der anvendes i øjeblikket, i lyset af den begrænsede AOP-mekanistiske dækning af hver af de aktuelt tilgængelige forsøgsmetoder uden brug af dyr (2) (3).

Denne forsøgsmetode (ARE-Nrf2-luciferase-assay) foreslås i forbindelse med den anden centrale begivenhed som forklaret i punkt 2. Der foreligger rapporter om, at hudsensibiliserende stoffer har medført gener, der reguleres af antioxidantrespons-elementet (ARE) (8) (9). Små elektrofile stoffer såsom hudsensibiliserende stoffer kan påvirke sensorproteinet Keap1 (Kelch-lignende SSG-associeret protein 1), f.eks. ved kovalent modifikation af cysteinrestkoncentrationen, hvilket fører til dissociering fra transskriptionsfaktoren Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2). Den dissocierede Nrf2 kan herefter aktivere ARE-afhængige gener såsom dem, der koder for fase II-detoxificerende enzymer (8) (10) (11).

I øjeblikket er det eneste in vitro-Nrf2-luciferase-assay, der er omfattet af denne forsøgsmetode, KeratinoSensTM-assayet, for hvilket man har gennemført valideringsundersøgelser (9) (12) (13) efterfulgt af en uafhængig peer review foretaget af Den Europæiske Unions referencelaboratorium for alternativer til dyreforsøg (EURL ECVAM) (14). KeratinoSensTM-assayet blev betragtet som videnskabeligt validt til at kunne bruges som en del af en IATA til at underbygge sondringen mellem hudsensibiliserende og ikke-hudsensibiliserende stoffer med henblik på fareklassificering og -mærkning (14). Laboratorier, som er villige til at anvende forsøgsmetoden, kan erhverve den rekombinante cellelinje, der anvendes i KeratinoSensTM-assayet, ved at indgå en licensaftale med udvikleren af forsøgsmetoden (15).

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

Definitioner findes i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER, ANVENDELSE OG BEGRÆNSNINGER

Eftersom aktivering af Keap1-Nrf2-ARE-vejen udelukkende vedrører den anden centrale begivenhed i hudsensibiliserings-AOP'en, er det usandsynligt, at oplysninger om forsøgsmetoder baseret på aktiveringen af denne vej alene er tilstrækkelige til at kunne konkludere noget om kemikaliers hudsensibiliseringspotentiale. Derfor bør data genereret med denne forsøgsmetode ses i sammenhæng med integrerede tilgange, såsom IATA, idet de kombineres med andre supplerende oplysninger, f.eks. hidrørende fra in vitro-assays vedrørende andre vigtige begivenheder for hudsensibiliserings-AOP'en samt ikke-forsøgsmetoder, herunder analogislutning fra analoge kemikalier. I litteraturen findes der eksempler på, hvordan man kan bruge ARE-Nrf2-luciferase-forsøgsmetoden sammen med andre oplysninger (13) (16) (17) (18) (19).

Denne forsøgsmetode kan bruges til at understøtte sondringen mellem hudsensibiliserende (dvs. UN GHS/CLP-kategori 1) og ikke-hudsensibiliserende stoffer i forbindelse med IATA. Denne forsøgsmetode kan ikke anvendes alene, hverken til at kategorisere hudsensibiliserende stoffer i underkategori 1A og 1B som defineret i UN GHS/CLP eller til at forudsige styrken i forbindelse med beslutninger om sikkerhedsvurdering. Afhængigt af lovrammen kan et positivt resultat imidlertid anvendes alene til at klassificere et kemikalie i UN GHS/CLP-kategori 1.

På baggrund af datasættet fra valideringsundersøgelsen og interne test i forbindelse med den uafhængige peer review af forsøgsmetoden viste KeratinoSens™-assayet sig at kunne overføres til laboratorier med erfaring i cellekulturer. Graden af reproducerbarhed i de forudsigelser, der kan forventes fra forsøgsmetoden, ligger i størrelsesordenen 85 % inden for og mellem laboratorier (14). Nøjagtigheden (77 % — 155/201), følsomheden (78 % — 71/91) og specificiteten (76 % — 84/110) af KeratinoSens™-assayet til sondring mellem hudsensibiliserende (dvs. UN GHS/CLP-kategori 1) og ikke-hudsensibiliserende stoffer sammenlignet med LLNA-resultaterne blev beregnet ved at benytte alle de data, der blev rapporteret til EURL ECVAM med henblik på evaluering og peer review af forsøgsmetoden (14). Disse tal svarer til de nyligt offentliggjorte tal baseret på interne test af ca. 145 stoffer (77 % nøjagtighed, 79 % følsomhed, 72 % specificitet) (13). Det er mere sandsynligt, at KeratinoSens™-assayet vil føre til for lave forudsigelser for kemiske stoffer med lav til moderat hudsensibiliserende styrke (dvs. UN GHS/CLP-underkategori 1B) i forhold til kemikalier med høj hudsensibiliserende styrke (dvs. UN GHS/CLP-underkategori 1A) (13) (14). Samlet set viser disse oplysninger nytteværdien af KeratinoSens™-assayet som bidrag til identifikation af hudsensibiliseringsfare. De nøjagtige værdier, der her angives for KeratinoSens™-assayet som en selvstændig forsøgsmetode, er imidlertid kun vejledende, da forsøgsmetoden bør overvejes i kombination med andre informationskilder i forbindelse med en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 9 ovenfor. I forbindelse med vurderingen af metoder til hudsensibilisering uden brug af dyr bør man desuden holde sig for øje, at LLNA samt andre dyreforsøg ikke fuldt ud afspejler situationen hos arten af interesse, dvs. mennesker.

Betegnelsen "testkemikalie" anvendes i denne forsøgsmetode om det, der testes, og vedrører ikke anvendeligheden af ARE-Nrf2-luciferase-forsøgsmetoden til test af stoffer og/eller blandinger. På grundlag af de nuværende tilgængelige data viste KeratinoSens™-assayet sig at være relevant for testkemikalier, der dækker en række forskellige organiske funktionelle grupper, reaktionsmekanismer, hudsensibiliseringsstyrke (som fastlagt ved in vivo-undersøgelser) og fysisk-kemiske egenskaber (9) (12) (13) (14). Man testede hovedsagelig stoffer med en enkelt bestanddel, men der findes også en begrænset mængde data om test af blandinger (20). Forsøgsmetoden kan ikke desto mindre teknisk set benyttes til stoffer med forskellige bestanddele og blandinger. Før brug af denne forsøgsmetode til lovmæssig test af en blanding til generering af data bør det imidlertid overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen. Ved test af stoffer med flere bestanddele eller blandinger bør der desuden tages hensyn til cytotoxiske bestanddeles eventuelle interferens med de observerede responser. Forsøgsmetoden gælder opløselige testkemikalier eller testkemikalier, der danner en stabil dispersion (dvs. en kolloid eller en suspension, hvor testkemikaliet ikke bundfældes eller separeres fra opløsningsmidlet i forskellige faser), enten i vand eller DMSO (herunder alle bestanddele af testkemikaliet ved test af et stof med forskellige

bestanddele eller en blanding). Testkemikalier, der ikke opfylder disse betingelser ved den højeste krævede slutkoncentration på 2 000 µM (jf. punkt 22), kan stadig testes ved lavere koncentrationer. I så fald kan resultater, der opfylder kriterierne for positivitet som beskrevet i punkt 39, stadig anvendes til at hjælpe med bestemmelsen af testkemikaliets som hudsensibiliserende, mens et negativt resultat, der er opnået med koncentrationer < 1 000 µM, bør betragtes som usikkert (se forudsigelsesmodellen i afsnit 39). Generelt vil stoffer med en LogP på op til 5 være testet med succes, mens ekstremt hydrofobe stoffer med en LogP over 7 ligger uden for forsøgsmetodens kendte anvendelsesområde (14). For stoffer med en LogP på mellem 5 og 7 foreligger der kun begrænsede oplysninger.

Negative resultater bør fortolkes med forsigtighed, da stoffer med en eksklusiv reaktivitet over for lysinrester kan identificeres som negative med forsøgsmetoden. På grund af den anvendte cellelinjes begrænsede metaboliske kapacitet (21) og på grund af forsøgsbetingelserne kan pro-haptener (dvs. kemikalier, der kræver enzymatisk aktivering f.eks. via P450-enzymet) og haptener (dvs. kemikalier, der aktiveres ved selvoxidering), især med en langsom oxideringsgrad, også give negative resultater. Testkemikalier, der ikke virker sensibiliserende, men som ikke desto mindre er kemiske stressstoffer, kan på den anden side give falsk positive resultater (14). Desuden er det ikke altid muligt at foretage en pålidelig vurdering af stærkt cytotoxiske testkemikalier. Endelig kan testkemikalier, der reagerer med luciferaseenzymet, forstyrre luciferasens aktivitet i cellebaserede assays og forårsage enten synlig hæmning eller øget luminescens (22). Eksempelvis findes der rapporter om, at phytoøstrogenkoncentrationer på over 1 µM forstyrrede luminescenssignalerne i andre luciferasebaserede reporter-genassays på grund af overaktivering af luciferasereporter-genet (23). Som følge heraf skal den luciferase-ekspression, som er opnået ved høje koncentrationer af phytoøstrogen eller lignende kemiske stoffer, der mistænkes for at forårsage phytoøstrogen-lignende overaktivering af luciferasereporter-genet, undersøges nøje (23). I de tilfælde, hvor det kan påvises, at forsøgsmetoden ikke er anvendelig til andre specifikke kategorier af testkemikalier, bør forsøgsmetoden ikke anvendes til disse kategorier.

Ud over at bidrage til sondringen mellem hudsensibiliserende og ikke-hudsensibiliserende stoffer leverer KeratinoSens™-assayet også oplysninger om koncentrationsrespons, der muligvis kan bidrage til vurderingen af sensibiliseringsstyrken ved anvendelse i integrerede metoder såsom IATA (19). Der er dog behov for yderligere arbejde, som fortrinsvis bør baseres på pålidelige data om mennesker, for at fastslå, hvordan resultaterne af KeratinoSens™-assayet kan bidrage til styrkevurderingen (24) og til placering af sensibiliserende stoffer i underkategorier i henhold til UN GHS/CLP.

PRINCIP FOR TESTEN

Til ARE-Nrf2-luciferase-forsøgsmetoden anvendes en udødeliggjort vedhæftende cellelinje, der er afledt af humane HaCaT-keratinocytter, som er stabilt transfekteret med et valgbart plasmid. Cellelinjen indeholder luciferasegenet under transskriptionskontrollen for en konstitutiv promotor, der er sammensmeltet med et ARE-element, som vides at blive opreguleret af kontaktsensibiliserende stoffer (25) (26). Luciferasesignalet afspejler de sensibiliserende stoffers aktivering af endogene Nrf2-afhængige gener, og afhængigheden af luciferasesignalet i den rekombinante cellelinje på Nrf2 er blevet dokumenteret (27). Dette giver mulighed for kvantitativ måling (ved luminescens-detektion) af luciferasegeninduktion ved hjælp af veldokumenterede lysproducerende luciferasesubstrater som en indikator for Nrf2-transskriptionsfaktorens aktivitet i celler efter eksponering for elektrofile stoffer.

Testkemikalierne anses for positive i KeratinoSens™-assayet, hvis de forårsager en statistisk signifikant induktion af luciferaseaktiviteten over en bestemt tærskel (dvs. > 1,5 gange eller 50 % stigning) under en bestemt koncentration, som ikke i væsentlig grad påvirker cellernes levedygtighed (dvs. under 1 000 µM og i en koncentration, hvor cellernes levedygtighed er på over 70 % (9) (12)). Med henblik herpå bestemmes den maksimale foldinduktion af luciferaseaktiviteten over opløsningsmiddelkontrollen (den negative kontrol) ($I_{\max}$). Da cellerne udsættes for serier af koncentrationer af testkemikalierne, skal den nødvendige koncentration for en statistisk signifikant induktion af luciferaseaktivitet over tærsklen (dvs. $EF_{1,5}$ -værdi) interpoleres fra dosis/respons-kurven (se punkt 32 for beregninger). Endelig bør der foretages parallelle målinger af cytotoxicitet for at vurdere, om niveauerne for induktion af luciferaseaktivitet forekommer ved subcytotoxiske koncentrationer.

Før rutinemæssig brug af ARE-Nrf2-luciferase-assayet, der hører til denne forsøgsmetode, bør laboratorierne godtgøre deres tekniske kompetence ved hjælp af de 10 kompetencestoffer, der findes opført i tillæg 2.

Der stilles ydeevnestandarder (28) til rådighed for at lette valideringen af nye eller ændrede in vitro-Nrf2-luciferase-forsøgsmetoder svarende til KeratinoSens™-assayet, og de gør det muligt at ændre denne forsøgsmetode i tide, så de kan medtages. Gensidig anerkendelse af data i henhold til OECD-aftalen vil kun være garanteret for forsøgsmetoder, der er valideret i henhold til ydeevnestandarderne, hvis disse forsøgsmetoder er gennemgået og medtaget i OECD's tilhørende testvejledning.

FREM GANGSMÅDE

I øjeblikket er den eneste metode, der er omfattet af denne forsøgsmetode, det videnskabeligt validerede KeratinoSens™-assay (9) (12) (13) (14). Standardprocedurer for KeratinoSens™-assayet er tilgængelige og bør anvendes ved gennemførelse og brug af metoden i laboratoriet (15). Laboratorier, som er villige til at anvende forsøgsmetoden, kan erhverve den rekombinante cellelinje, der anvendes i KeratinoSens™-assayet, ved at indgå en licensaftale med udvikleren af forsøgsmetoden. Følgende afsnit indeholder en beskrivelse af de vigtigste komponenter og procedurer i Nrf2-luciferase-forsøgsmetoden.

Fremstilling af keratinocytkulturerne

Der bør anvendes en transgen cellelinje med stabil indsættelse af luciferase-reportergenet, der kontrolleres af ARE-elementet (f.eks. KeratinoSens™-cellelinjen). Ved modtagelsen opformeres cellerne (f.eks. 2-4 generationer) og opbevares frosne som en homogen stamme. Celler fra den oprindelige stamme kan opformeres til det maksimale antal generationer (dvs. 25 for KeratinoSens™) og anvendes til rutinetest under anvendelse af det relevante opbevaringsmedium (for KeratinoSens™ er der tale om DMEM indeholdende serum og Geneticin).

Ved testen bør cellerne være 80-90 % sammenflydende, og det bør sikres, at cellerne aldrig er fuldkommen sammenflydende. En dag inden testen høstes cellerne og fordeles i plader med 96 brønde (10 000 celler/brønd for KeratinoSens™). Man bør være opmærksom på at undgå sedimentering af cellerne under udsåningen, så der sikres en ensartet fordeling af cellerne i brøndene. I modsat fald kan dette trin medføre stor variation fra brønd til brønd. For hver gentagelse anvendes tre replikater til måling af luciferaseaktivitet, mens et parallelt replikat bruges til celleveddygtighedsassayet.

Præparering af testkemikalie og kontrolstoffer

Testkemikalien og kontrolstofferne præpares på dagen for testen. For KeratinoSens™-assayet opløses testkemikalierne i dimethylsulfoxid (DMSO) til den ønskede slutkoncentration (f.eks. 200 mM). DMSO-opløsninger kan betragtes som selvsteriliserende, og der er således ikke behov for steril filtrering. Testkemikalier, der ikke er opløselige i DMSO, opløses i sterilt vand eller dyrkningsmedium, og opløsningerne steriliseres ved f.eks. filtrering. For et testkemikalie, som ikke har nogen defineret molekylvægt, fremstilles der en stamopløsning i en standardkoncentration (40 mg/ml eller 4 % (vægt/volumen)) i KeratinoSens™-assayet. Hvis der benyttes andre opløsningsmidler end DMSO, vand eller dyrkningsmedium, bør der fremlægges en tilstrækkelig videnskabelig begrundelse for dette.

Baseret på DMSO-stamopløsninger af testkemikaliets foretages der seriefortyndinger med DMSO for at opnå 12 master-koncentrationer af det kemikalie, der skal testes (fra 0,098 til 200 mM i KeratinoSens™-assayet). For et testkemikalie, der ikke er opløseligt i DMSO, foretages fortyndingerne for at opnå master-koncentrationerne med sterilt vand eller sterilt dyrkningsmedium. Uafhængigt af det anvendte opløsningsmiddel fortyndes skal master-koncentrationerne herefter fortyndes yderligere 25 gange i dyrkningsmedium indeholdende serum og endelig bruges til behandling med en yderligere fortyndingsfaktor på 4 gange, så slutkoncentrationen af testkemikaliets varierer fra 0,98 til 2 000 µM i KeratinoSens™-assayet. Alternative koncentrationer kan bruges, hvis det er begrundet (f.eks. i tilfælde af cytotoxicitet eller dårlig opløselighed).

Den negative kontrol (opløsningsmiddelkontrollen), der anvendes i KeratinoSens™-assayet, er DMSO (CAS-nr. 67-68-5, ≥ 99 % renhed), hvortil der præpareres seks brønde pr. plade. Der foretages samme fortynding som beskrevet for master-koncentrationerne i punkt 22, således at slutkoncentrationen i den negative kontrol (opløsningsmiddelkontrollen) er 1 %, der vides ikke at påvirke cellernes levedygtighed, og som svarer til samme DMSO-koncentration som i testkemikaliets og i den positive kontrol. For et testkemikalie, der ikke er opløseligt i DMSO, og hvor fortyndingerne er foretaget i vand, skal DMSO-niveauet for den endelige testopløsning i alle brønde justeres til 1 % som for de øvrige testkemikalier og kontrolstoffer.

Den positive kontrol, der bruges i KeratinoSens™-assayet, er kanelaldehyd (CAS-nr. 14371-10-9, ≥ 98 % renhed), hvor der fremstilles en serie på fem master-koncentrationer fra 0,4 til 6,4 mM i DMSO (fra en 6,4 mM stamopløsning), der fortyndes som beskrevet for master-koncentrationer i punkt 22, således at slutkoncentrationen af den positive kontrol går fra 4 til 64 µM. Andre egnede positive kontroller, helst med EC_{1,5}-værdier i mellemområdet, anvendes, hvis der foreligger historiske data, som kan anvendes til at udlede sammenlignelige acceptkriterier for kørsel.

Påføring af testkemikalier og kontrolstoffer

For hvert testkemikalie og positive kontrolstof kræves der et forsøg for at udlede en forudsigelse (positiv eller negativ), der består af mindst to uafhængige gentagelser med hver tre replikater (dvs. n=6). I tilfælde af modstridende resultater for de to uafhængige gentagelser bør der udføres en tredje gentagelse med tre replikater (dvs. n=9). Hver selvstændig gentagelse udføres på en anden dag med en frisk stamopløsning af testkemikalier og uafhængigt høstede celler. Cellerne kan imidlertid komme fra den samme generation.

Efter podning som beskrevet i punkt 20 dyrkes cellerne i 24 timer i mikrotiterplader med 96 brønde. Herefter fjernes mediet og erstattes af frisk dyrkningsmedium (150 µl dyrkningsmedium med serum, men uden Geneticin for KeratinoSens™), hvortil der tilsættes 50 µl af det 25 gange fortyndede testkemikalie og kontrolstofferne. Mindst en brønd pr. plade bør være tom (ingen celler og ingen behandling) for at gøre det muligt at vurdere baggrundsværdierne.

De behandlede plader inkuberes derefter i ca. 48 timer ved 37 ± 1 °C under tilstedeværelse af 5 % CO₂ i KeratinoSens™-assayet. Der bør træffes forholdsregler for at undgå, at flygtige testkemikalier fordamper, og for at undgå krydskontaminering med testkemikalier mellem brøndene, f.eks. ved at dække pladerne med en folie inden inkubering med testkemikalierne.

Målinger af luciferaseaktivitet

Tre faktorer er afgørende for at sikre relevante luminescens aflæsninger:

- valg af et følsomt luminometer
- brug af et pladeformat med tilstrækkelig højde til at undgå krydskontaminering med lys og
- brug af et luciferasesubstrat med tilstrækkelig lysvirkning til at sikre tilstrækkelig følsomhed og lav variabilitet.

Inden testen udføres der et kontrolofforsøg med opsætningen som beskrevet i tillæg 3 for at sikre, at disse tre punkter er opfyldt.

Efter 48 timers eksponering med testkemikaliet og kontrolstofferne i KeratinoSens™-assayet vaskes cellerne med fosfatbufferet saltopløsning, og den relevante lysisbuffer for luminescens aflæsninger tilsættes hver brønd i 20 min. ved stuetemperatur.

Plader med cellelysat placeres derefter i luminometeret til aflæsning, som i KeratinoSens™-assayet er programmeret til at: i) tilsætte luciferasesubstrat til hver brønd (dvs. 50 µl), ii) vente 1 sekund og iii) integrere luciferaseaktiviteten i 2 sekunder. Hvis man anvender alternative indstillinger, f.eks. som følge af den anvendte luminometermodel, bør dette begrundes. Desuden kan man benytte et lyssubstrat, forudsat at kvalitetskontrolofforsøget i tillæg 3 er lykkedes.

Vurdering af cytotoxicitet

For KeratinoSens™-assayet for cellelevedygtighed udskiftes mediet efter 48 timers eksponering med frisk medium med MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, thiazolylblåt tetrazolium-bromid, CAS-nr. 298-93-1], og cellerne inkuberes i 4 timer ved 37 °C under tilstedeværelse af 5 % CO₂. Herefter fjernes MTT-mediet, og cellerne lyseres (f.eks. ved tilsætning af 10 % SDS-opløsning til hver brønd) natten over. Efter omrystning måles absorptionen ved f.eks. 600 nm med et fotometer.

DATA OG RAPPORTERING

Dataevaluering

Følgende parametre beregnes i KeratinoSens™-assayet:

- den maksimale gennemsnitlige foldinduktion af luciferaseaktivitet ($I_{\max}$), der er observeret ved en hvilken som helst koncentration af testkemikaliet og den positive kontrol
- EC_{1,5}-værdien, der repræsenterer den koncentration, hvor en induktion af luciferaseaktiviteten på over tærsklen på 1,5 fold (dvs. 50 % større luciferaseaktivitet) blev opnået
- IC₅₀- og IC₃₀-koncentrationsværdierne for 50 % og 30 % reduktion af cellelevedygtigheden.
- Foldinduktionen af luciferaseaktiviteten beregnes ved hjælp af ligning 1, og den samlede maksimale foldinduktion ($I_{\max}$) beregnes som et gennemsnit af de enkelte gentagelser.

Ligning 1:

$$\text{Fold induktion} = \frac{(L_{\text{sample}} - L_{\text{blank}})}{(L_{\text{solvent}} - L_{\text{blank}})}$$

hvor

L_{sample} er luminescens aflæsningen i brønden med testkemikaliet

L_{blank} er luminescens aflæsningen i brønden med blindprøven, der ikke indeholder celler og ikke er blevet behandlet

L_{solvent} er den gennemsnitlige luminescens aflæsning i brønde, der indeholder celler og opløsningsmiddelkontrol (negativ kontrol)

EC_{1,5} beregnes ved lineær interpolation i henhold til ligning 2, og den samlede EC_{1,5} beregnes som det geometriske gennemsnit af de enkelte gentagelser.

Ligning 2:

$$EC_{1,5} = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1,5 - I_a}{I_b - I_a} \right) + C_a$$

hvor

C_a er den laveste koncentration i μM med $> 1,5$ fold induktion

C_b er den højeste koncentration i μM med $< 1,5$ fold induktion

I_a er foldinduktionen målt ved den laveste koncentration med $> 1,5$ fold induktion (gennemsnit af tre replikatbrønde)

I_b er foldinduktionen målt ved den højeste koncentration med $< 1,5$ fold induktion (gennemsnit af tre replikatbrønde)

Levedygtigheden beregnes med ligning 3:

Ligning 3:

$$\text{Levedygtighed} = \frac{(V_{\text{sample}} - V_{\text{blank}})}{V_{\text{solvent}} - V_{\text{blank}}} \times 100$$

hvor

V_{sample} er MTT-absorbansen i brønden med testkemikali

V_{blank} er MTT-absorbans aflæsningen i brønden med blindprøven, der ikke indeholder celler og ikke er blevet behandlet

V_{solvent} er den gennemsnitlige MTT-absorbans aflæsning i brønde, der indeholder celler og opløsningsmiddelkontrol (negativ kontrol)

IC_{50} og IC_{30} beregnes ved lineær interpolation i henhold til ligning 4, og den samlede IC_{50} og IC_{30} beregnes som det geometriske gennemsnit af de enkelte gentagelser.

Ligning 4:

$$IC_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100 - x) - V_a}{V_b - V_a} \right) + C_a$$

hvor

X er den procentvise reduktion i den koncentration, der skal beregnes (50 og 30 for IC_{50} og IC_{30})

C_a er den laveste koncentration i μM med $> x$ % reduktion af levedygtigheden

C_b er den højeste koncentration i μM med $< x$ % reduktion af levedygtigheden

V_a er den procentvise levedygtighed ved den laveste koncentration med $> x$ % reduktion af levedygtigheden

V_b er den procentvise levedygtighed ved den højeste koncentration med $< x$ % reduktion af levedygtigheden

For hver koncentration, der udviser $> 1,5$ foldinduktion af luciferaseaktivitet, beregnes den statistiske signifikans (f. eks. ved hjælp af den tohalede Student's t-test), hvor man sammenligner luminescensværdierne for de tre replikate prøver med luminescensværdierne i brøndene med opløsningsmiddelkontrollen (den negative kontrol) for at afgøre, hvorvidt induktionen af luciferaseaktivitet er statistisk signifikant ($p < 0,05$). Den laveste koncentration med $> 1,5$ fold induktion af luciferaseaktivitet er den værdi, der bestemmer $EC_{1,5}$ -værdien. Det undersøges i hvert enkelt tilfælde, om denne værdi er lavere end IC_{30} -værdien, hvilket indikerer, at der er mindre end 30 % reduktion i cellelevedygtigheden ved den $EC_{1,5}$ -værdi, der fastlægger koncentrationen.

Det anbefales, at data kontrolleres visuelt ved hjælp af grafer. Hvis der ikke kan konstateres nogen tydelig dosis/respons-kurve, eller dosis/respons-kurven er bifasisk (dvs. grænsen på 1,5 passeres to gange), bør forsøget gentages for at kontrollere, om dette er specifikt for testkemikaliet eller skyldes en eksperimentel artefakt. Hvis den bifasiske respons kan reproducere ved et uafhængigt forsøg, bør den laveste $EC_{1,5}$ -værdi (koncentrationen, hvor grænsen på 1,5 krydses første gang) rapporteres.

I de sjældne tilfælde, hvor en statistisk ikke-signifikant induktion over 1,5 fold observeres efterfulgt af en højere koncentration med en statistisk signifikant induktion, betragtes resultaterne af denne gentagelse kun som gyldige og positive, hvis den statistisk signifikante induktion over grænsen på 1,5 blev opnået for en ikke-cytotoksisk koncentration.

Endelig gælder det for testkemikalier, der genererer en 1,5 fold induktion eller mere allerede ved den laveste testkoncentration på 0,98 μM , at $EC_{1,5}$ -værdien på $< 0,98$ fastsættes baseret på en visuel kontrol af dosis/respons-kurven.

Acceptkriterier

Følgende acceptkriterier bør være opfyldt ved brug af KeratinoSensTM-assayet. For det første bør den induktion af luciferaseaktivitet, der er opnået med den positive kontrol, kanelaldehyd, være statistisk signifikant over en tærskel på 1,5 (f.eks. ved hjælp af en t-test) i mindst en af de testede koncentrationer (fra 4 til 64 μM).

For det andet bør $EC_{1,5}$ -værdien ligge inden for to standardafvigelser af det historiske gennemsnit for testfaciliteten (f.eks. mellem 7 μM og 30 μM baseret på valideringsdatasættet), der bør ajourføres regelmæssigt. Desuden bør den gennemsnitlige induktion i de tre replikater for kanelaldehyd på 64 μM være mellem 2 og 8. Hvis sidstnævnte kriterium ikke er opfyldt, bør dosisresponsen for kanelaldehyden kontrolleres nøje, og disse test må kun accepteres, hvis der er en tydelig dosisrespons med stigende induktion af luciferaseaktivitet ved stigende koncentrationer af den positive kontrol.

Endelig bør den gennemsnitlige variationskoefficient for luminescens aflæsningen af DMSO for den negative kontrol (opløsningsmiddelkontrollen) være under 20 % i hver gentagelse bestående af seks brønde testet i tre eksemplarer. Hvis variationen er højere, bør resultaterne kasseres.

Fortolkning af resultater og forudsigelsesmodel

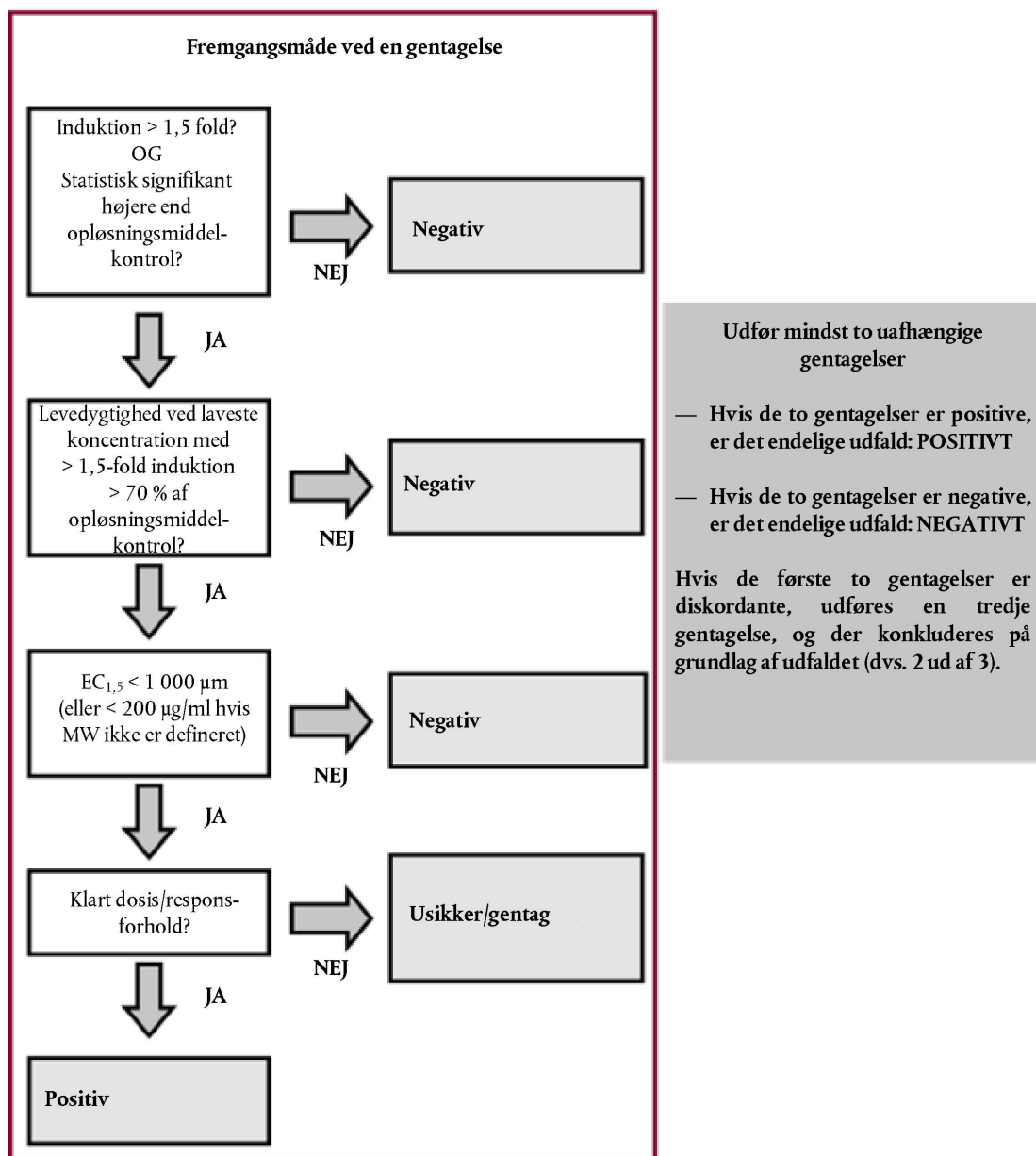
En KeratinoSensTM-forudsigelse anses for positiv, hvis følgende fire betingelser alle er opfyldt i to ud af to eller i de samme to ud af tre gentagelser; ellers betragtes KeratinoSensTM-forudsigelsen som negativ (figur 1):

1. I_{max} er større end ($>$) 1,5 fold og med statistisk signifikant forskellighed sammenlignet med opløsningsmiddelkontrollen (den negative kontrol) (som blev bestemt med den tohalede uparrede Student's t-test).
2. Cellernes levedygtighed er større end ($>$) 70 % ved den laveste koncentration med induktion af luciferaseaktivitet over 1,5 fold (dvs. ved den $EC_{1,5}$ -fastsættende koncentration).
3. $EC_{1,5}$ -værdien er mindre end ($<$) 1 000 μM (eller < 200 $\mu\text{g/ml}$ for testkemikalier uden defineret molekylvægt).
4. Der findes en tilsyneladende generel dosisrespons for luciferaseinduktion (eller en bifasisk respons som nævnt i punkt 33).

Hvis alle de tre første betingelser er opfyldt i en given gentagelse, men der ikke kan observeres en klar dosisrespons for luciferaseinduktionen, bør resultatet af den pågældende gentagelse betragtes som usikkert, og der kan være behov for yderligere undersøgelser (figur 1). Desuden bør et negativt resultat opnået med koncentrationer < 1 000 μM (eller < 200 $\mu\text{g/ml}$ for testkemikalier uden defineret molekylvægt) også betragtes som usikkert (jf. punkt 11).

Figur 1

Forudsigelsesmodel, der anvendes i KeratinoSens™-assayet. En KeratinoSens™-forudsigelse bør overvejes inden for rammerne af en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 9 og 11.



I sjældne tilfælde kan testkemikalier, der inducerer luciferaseaktivitet meget tæt på de cytotoxiske niveauer, være positive i nogle gentagelser ved ikke-cytotoxiske niveauer (dvs. ved $EC_{1,5}$ -bestemmende koncentrationer under ($<$) IC_{30}), og i andre gentagelser kun ved cytotoxiske niveauer (dvs. ved $EC_{1,5}$ -bestemmende koncentrationer over ($>$) IC_{30}). Sådanne testkemikalier testes på ny med en smallere dosisresponsanalyse under anvendelse af en lavere fortyndingsfaktor (f.eks. en 1,33 eller $\sqrt{2}$ ($\approx 1,41$) fold fortynding mellem brøndene) for at fastslå, om induktionen har fundet sted ved cytotoxiske niveauer eller ej (9).

Testrapport

Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie

— Stof med kun en bestanddel

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

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

Kontroller

- Positiv kontrol
 - kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel og/eller andre identifikatorer
 - fysisk udseende, vandopløselighed, DMSO-opløselighed, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber i den udstrækning, det er muligt og relevant
 - renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.
 - eventuel behandling inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)
 - testede koncentrationer
 - opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt
 - reference til historiske positive kontrolresultater, der udviser passende acceptkriterier for kørsel, hvis det er relevant.
- Negativ kontrol (bærestofkontrol)
 - kemisk identifikation, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn(e), CAS-nummer/numre og/eller andre identifikatorer
 - renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt osv.
 - fysisk udseende, molekylvægt og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber ved brug af andre negative kontroller/bærestoffer end dem, der er nævnt i forsøgsmetoden, i det omfang det er muligt
 - opbevaring og stabilitet i det omfang, det er muligt
 - begrundelse for valg af opløsningsmiddel for de enkelte testkemikalier

betingelser for forsøgsmetoden

- navn og adresse på sponsoren, testfaciliteten og undersøgelseslederen
- beskrivelse af forsøgsmetoden
- anvendt cellelinje, opbevaringsforhold og kilde (f.eks. det anlæg, som den er hentet fra)
- antal generationer og graden af konfluens for de celler, der anvendes til test
- anvendt celletællingsmetode til udsåning inden testen, og de foranstaltninger, der er truffet for at sikre en ensartet fordeling af celleantal (jf. punkt 20)
- anvendt luminometer (f.eks. model), herunder instrumentindstillinger, det anvendte luciferasesubstrat og dokumentation for hensigtsmæssige luminescensmålinger baseret på kontrolprøven, der er beskrevet i tillæg 3
- den procedure, der anvendes til at påvise laboratoriets kompetence til at anvende forsøgsmetoden (f.eks. ved test af kompetencestoffer) eller til at påvise reproducerbare resultater af forsøgsmetoden over tid.

Testprocedure

- antal anvendte gentagelser og replikater
- koncentrationer af testkemikaliets, tilsætningsprocedure og eksponeringstid (hvis anderledes end anbefalet)
- beskrivelse af de anvendte vurderings- og beslutningskriterier
- beskrivelse af de benyttede undersøgelsesacceptkriterier
- beskrivelse af eventuelle ændringer i testproceduren.

Resultater

- opstilling i tabelform af $I_{\max}$, $EC_{1,5}$ og levedygtighedsværdier (dvs. IC_{50} , IC_{30}), som er opnået for testkemikaliets og for den positive kontrol for hver gentagelse samt middelværdierne ($I_{\max}$: gennemsnit, $EC_{1,5}$ og levedygtighedsværdier: geometrisk middelværdi) og standardafvigelse beregnet ved hjælp af data fra de enkelte gentagelser samt en angivelse af vurderingen af testkemikaliets i henhold til forudsigelsesmodellen
- opnået variationskoefficient ved luminescensaflysningerne for den negative kontrol for hvert forsøg
- graf, der viser dosis/respons-kurver for induktion af luciferaseaktivitet og levedygtighed
- beskrivelse af eventuelle andre relevante observationer, hvis det er relevant.

Diskussion af resultaterne

- diskussion af de resultater, der er opnået med KeratinoSens™-assayet
- vurdering af forsøgsmetodens resultater inden for rammerne af en IATA, hvis der foreligger andre relevante oplysninger.

Konklusion

LITTERATUR

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Tilgængelig på: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) 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.

- (3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Archives of Toxicology* 85, 367-485.
- (4) Kapitel B.42 i dette bilag: Hudsensibilisering: Assay på lokale lymfeknuder.
- (5) Kapitel B.6 i dette bilag: Hudsensibilisering.
- (6) Kapitel B.50 i dette bilag: Hudsensibilisering: Assay på lokale lymfeknuder: DA.
- (7) Kapitel B.51 i dette bilag: Hudsensibilisering: Assay på lokale lymfeknuder: BrdU-ELISA.
- (8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Toxicological Sciences* 113, 284-292.
- (9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245, 281-290.
- (10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1779-1791.
- (11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1(1), 45-49.
- (12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. *Toxicol. In Vitro* 25, 733-744.
- (13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, 33, 1337-1352.
- (14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Tilgængelig på: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.
- (15) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™, 17 pp. Tilgængelig på: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>
- (16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. *Toxicol. Sci.* 107, 106-121.
- (17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 60, 389-400.
- (18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 63, 489-504.

- (19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *J Appl Toxicol.* 33, 1353-1364.
 - (20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. *Toxicology In Vitro* 27, 1220-1225.
 - (21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1699.
 - (22) 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, 646-657.
 - (23) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris.
 - (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
 - (25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. *J. Invest. Dermatol.*, 126, 1813-1822.
 - (26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol. Lett.* 150, 301-316.
 - (27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. *Toxicol. in vitro* 27, 2225-2232.
 - (28) OECD (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 213.
 - (29) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris, France.
 - (30) NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides — (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 pp. <http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf>
-

Tillæg 1

DEFINITIONER

Nøjagtighed: Overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af »relevans«. Udtrykket benyttes ofte som synonym for »konkordans«, forstået som den andel af korrekte udfald, forsøgsmetoden fører til (29).

AOP (Adverse Outcome Pathway): Sekvens af begivenheder fra den kemiske struktur af et målkemikalie eller en gruppe af ensartede kemikalier gennem den molekylære udløsende begivenhed til et in vivo-resultat af interesse (2).

ARE: Antioxidantresponsselement (også kaldet EpRE, elektrofilresponsselement) — et responselement, der findes i upstream-promotorområdet for mange cytopbeskyttende gener og fase II-gener. Når det aktiveres af Nrf2, igangsætter det transskriptionsinduktionen for disse gener.

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

Variationskoefficient: Et mål for variation, der beregnes for en gruppe af replikationsdata ved at dividere standardafvigelsen med middelværdien. Den kan ganges med 100 for at opnå en procentsats.

EC_{1,5}: Interpoleret koncentration for en 1,5 fold luciferaseinduktion.

IC₃₀: Koncentration, der medfører nedsættelse af cellelevedygtigheden med 30 %.

IC₅₀: Koncentration, der medfører nedsættelse af cellelevedygtigheden med 50 %.

Fare: Den iboende egenskab ved et middel eller en situation, som kan forårsage skade, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende middel.

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

I_{max}: Maksimal induktionsfaktor for luciferaseaktivitet sammenlignet med opløsningsmiddelkontrollen (den negative kontrol) målt for en hvilken som helst koncentration af testkemikaliat.

Keap1: Kelch-lignende ECH-associeret protein 1 — et sensorprotein, der kan regulere Nrf2-aktiviteten. Under ikke-inducerede betingelser er Keap1-sensorproteinet rettet mod Nrf2-transskriptionsfaktoren ubitquitinylering og proteolytisk nedbrydning i proteasomet. Kovalent modifikation af de reaktive cysteinrester af Keap 1 med små molekyler kan føre til, at Nrf2 adskilles fra Keap1 (8) (10) (11).

Blanding: En blanding eller opløsning, der er sammensat af to eller flere stoffer, hvori de ikke reagerer (1).

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

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

Nrf2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 — en transskriptionsfaktor i antioxidantresponsvejen. Når Nrf2 ikke er ubiquitinyleret, opbygger det cytoplasmaet og forflytter sig ind i kernen, hvor det kombineres med ARE i upstream-promotorområdet hos mange cytopbeskyttende gener og igangsætter deres transskription (8) (10) (11).

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

Relevans: Beskrivelse af sammenhængen mellem testen og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang testen måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Forsøgsmetodens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dens relevans (29).

Pålidelighed: Mål for, i hvilken grad en forsøgsmetode kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og repeterbarhed inden for laboratorier (29).

Reproducerbarhed: Overensstemmelse mellem resultater af test af samme kemikalie med samme testprotokol (29).

Følsomhed: Andel af alle positive/aktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved forsøgsmetoden. Det er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (29).

Opløsningsmiddel-/bærestofkontrol: Replikant, der indeholder alle bestanddele af et testsystem, undtagen testkemikaliets, men inklusive det anvendte opløsningsmiddel. Det anvendes til at bestemme basisresponsen for prøver behandlet med testkemikaliets, der er opløst i det samme opløsningsmiddel.

Specificitet: Andel af alle negative/inaktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved forsøgsmetoden. Det er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (29).

Stof: Grundstoffer og forbindelser heraf, naturlige eller industrielt fremstillede, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, som kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning (1).

Testkemikalie: Betegnelsen »testkemikalie« henviser til det, der bliver testet.

De Forenede Nationers globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals — UN GHS): Et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, risikosætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljø (1).

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

Gyldig forsøgsmetode: En forsøgsmetode, der anses for at være tilstrækkeligt relevant og pålidelig til et bestemt formål, og som er baseret på videnskabeligt forsvarlige principper. En forsøgsmetode har aldrig absolut gyldighed, men kun i forbindelse med et bestemt formål (29).

Tillæg 2

KOMPETENCESTOFFER

In vitro-hudsensibilisering: ARE-Nrf2-luciferase-forsøgsmetoden

Før rutinemæssig brug af denne forsøgsmetode bør laboratorierne godtgøre deres tekniske kompetence ved at opnå den forventede KeratinoSens™-forudsigelse på korrekt vis for de 10 kompetencestoffer, der anbefales i tabel 1, og ved at opnå de EC_{1,5}- og IC₅₀-værdier, der falder ind under de respektive referenceområder for 1,5 ud af de 10 kompetencestoffer. Disse kompetencestoffer er udvalgt således, at de repræsenterer responsområdet for hudsensibiliseringsfare. Andre udvælgelseskriterier er kommerciel tilgængelighed, tilgængelighed af in vivo-referencer af høj kvalitet og tilgængelighed af in vitro-data af høj kvalitet for KeratinoSens™-assayet.

Tabel 1

Anbefalede stoffer til godtgørelse af teknisk kompetence i anvendelse af KeratinoSens™-assayet

Kompetencestoffer	CASRN	Fysisk form	In vivo-forudsigelse ⁽¹⁾	KeratinoSens™ Forudsigelse ⁽²⁾	EC _{1,5} (µM)-referenceinterval ⁽³⁾	IC ₅₀ (µM)-referenceinterval ⁽³⁾
Isopropanol	67-63-0	Flydende	Ikke-sensibiliserende	Negativ	> 1 000	> 1 000
Salicylsyre	69-72-7	Fast	Ikke-sensibiliserende	Negativ	> 1 000	> 1 000
Mælkesyre	50-21-5	Flydende	Ikke-sensibiliserende	Negativ	> 1 000	> 1 000
Glycerol	56-81-5	Flydende	Ikke-sensibiliserende	Negativ	> 1 000	> 1 000
Kanelalkohol	104-54-1	Fast	Sensibiliserende (svagt)	Positiv	25-175	> 1 000
Ethylenglycoldimethacrylat	97-90-5	Flydende	Sensibiliserende (svagt)	Positiv	5-125	> 500
2-mercaptobenzo-thiazol	149-30-4	Fast	Sensibiliserende (moderat)	Positiv	25-250	> 500
Methyldibromglutaronitril	35691-65-7	Fast	Sensibiliserende (stærkt)	Positiv	< 20	20-100
4-methylaminophenolsulfat	55-55-0	Fast	Sensibiliserende (stærkt)	Positiv	< 12,5	20-200
2,4-dinitro-chlor-benzen	97-00-7	Fast	Sensibiliserende (ekstremt)	Positiv	< 12,5	5-20

⁽¹⁾ Prognoser for in vivo-fare og (styrke) er baseret på LLNA-data (13). In vivo-styrken er beregnet ud fra de kriterier, der foreslås af ECETOC (24).

⁽²⁾ Man bør overveje en KeratinoSens™-forudsigelse inden for rammerne af en IATA og i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 9 og 11 i denne forsøgsmetode.

⁽³⁾ På baggrund af de historiske observerede værdier (12).

Tillæg 3

KVALITETSKONTROL AF LUMINESCENS MÅLINGER

Grundlæggende forsøg til sikring af optimale luminescensmålinger i KeratinoSens™-assayet

Følgende tre parametre er afgørende for at sikre opnåelsen af pålidelige resultater med luminometeret:

- tilstrækkelig følsomhed, der giver en stabil baggrund i kontrolbrøndene
- ingen gradient over pladen som følge af lange aflæsningstider
- ingen lysforurening af hosliggende brønde fra stærkt aktive brønde.

Inden testen anbefales det at sikre passende luminescensmålinger ved at teste en kontrolpladeopstilling som beskrevet nedenfor (tredobbelt analyse).

Pladeopstilling for første kontroltest

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	EGDMA 0,98	EGDMA 1,95	EGDMA 3,9	EGDMA 7,8	EGDMA 15,6	EGDMA 31,25	EGDMA 62,5	EGDMA 125	EGDMA 250	EGDMA 500	EGDMA 1 000	EGDMA 2 000
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	CA 4	CA 8	CA 16	CA 32	CA 64	Blind- prøve

EGDMA = Ethylenglycoldimethacrylat (CAS-nr.: 97-90-5, et kraftigt inducerende kemikalie)

CA = kanelaldehyd, positivreference (CAS-nr.: 104-55-2)

Analysen af kvalitetskontrollen bør godtgøre:

- en klar dosisrespons i række D, med $I_{\max} > 20$ fold over baggrundsværdien (i de fleste tilfælde opnås $I_{\max}$ -værdier mellem 100 og 300)

- ingen dosisrespons i række C og E (ingen induktionsværdi over 1,5 (helst ikke over 1,3) som følge af eventuel let baggrundsforurening, navnlig ved siden af meget aktive brønde i EGDMA-rækken)
 - ingen statistisk signifikant forskel mellem række A, B, C, E, F og G (dvs. ingen gradient over pladen)
 - variationen bør ikke være under 20 % i nogen af rækkerne A, B, C, E, F og G og DMSO-brøndene i række H (dvs. stabil baggrund).
-

B.61 Fluoresceinudsivnings-forsøgsmetoden til identifikation af øjenætsende stoffer og stærkt øjenirriterende stoffer

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline (TG)) 460 (2012). Fluoresceinudsivnings- (FL) forsøgsmetoden er en in vitro-forsøgsmetode, som kan anvendes under visse omstændigheder og med særlige begrænsninger til at klassificere kemikalier (stoffer og blandinger) som øjenætsende stoffer og stærkt øjenirriterende stoffer som defineret i De Forenede Nationers (FN) globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (GHS) (kategori 1), forordning (EF) nr. 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (CLP) ⁽¹⁾ (kategori 1) og U.S. Environmental Protection Agency (EPA) (Kategori I) (1)(2). Ved denne forsøgsmetode defineres stærkt øjenirriterende stoffer som kemikalier, der forårsager vævsødelæggelse i øjet efter indgivelse af testkemikaliets, som ikke er reversible inden for 21 dage, eller som forårsager alvorlig fysisk synsnedsettelse, mens øjenætsende stoffer er kemikalier, som forårsager irreversibel vævsødelæggelse. Disse kemikalier klassificeres som UN GHS-kategori 1, EU CLP-kategori 1 eller U.S. EPA-kategori I.

Selv om FL-forsøgsmetoden ikke betragtes som værende en fuldstændig erstatning for in vivo-kaninøjentesten, anbefales det at anvende FL som del af en trindelteststrategi for forskriftsmæssig klassificering og mærkning. Det betyder, at FL anbefales som første trin i en top-down-tilgang til identifikation af øjenætsende stoffer/stærkt øjenirriterende stoffer specifikt for begrænsede typer af kemikalier (dvs. vandopløselige stoffer og blandinger) (3) (4).

I dag er det generelt accepteret, at der i den nærmeste fremtid ikke vil være en enkelt in vitro-øjenirritationstest, som vil kunne erstatte in vivo-øjentesten (TM B.5 (5)) til forudsigelse af hele spektret af irritation for forskellige kemikaliegrupper. Strategiske kombinationer af flere alternative forsøgsmetoder i en (trinvis) teststrategi kan dog muligvis erstatte in vivo-øjentesten (4). Det er meningen, at top-down-metoden (4) skal anvendes, når et kemikalie på grundlag af de foreliggende oplysninger forventes at være stærkt øjenirriterende.

På grundlag af den forudsigelsesmodel, der beskrives i punkt 35, kan FL-forsøgsmetoden bruges til at identificere kemikalier inden for et begrænset anvendelsesområde som øjenætsende stoffer/stærkt øjenirriterende stoffer (UN GHS-kategori 1, EU CLP kategori 1, U.S. EPA-kategori I) uden yderligere test. Det samme forudsættes for blandinger, selv om blandinger ikke blev anvendt ved valideringen. Derfor kan FL-forsøgsmetoden anvendes til at bestemme kemikaliers evne til at fremkalde øjenirritation/ætsning i henhold til den sekventielle teststrategi i TM B.5 (5). Et kemikalie, der ikke forudses som værende øjenætsende eller stærkt øjenirriterende med FL-forsøgsmetoden, vil imidlertid skulle testes med en eller flere supplerende forsøgsmetoder (in vitro og/eller in vivo), som er i stand til præcist at identificere i) kemikalier, der in vitro er falsk negative øjenætsende stoffer/stærkt øjenirriterende stoffer i FL-testen (UN GHS-kategori 1, EU CLP kategori 1, U.S. EPA-kategori I), ii) kemikalier, der ikke er klassificeret som øjenætsende/øjenirriterende (UN GHS uden for kategori, EU CLP uden for kategori, U.S. EPA-kategori IV) og/eller iii) kemikalier, der er moderat/mildt øjenirriterende (UN GHS-kategori 2A og 2B, EU CLP kategori 2, U.S. EPA-kategori II og III).

Formålet med denne forsøgsmetode er at beskrive de procedurer, som anvendes til at vurdere et testkemikalies potentielle øjenætsende eller stærkt øjenirriterende virkning som målt ved dets evne til at inducere skade på et impermeabelt, konfluerende epitelmonolag. Integriteten af transepitelpermeabilitet er en vigtig funktion ved et epitel som det, der findes i conjunctiva og cornea. Transepitelpermeabilitet styres af forskellige "tight junctions". Øget permeabilitet af cornea-epitelet in vivo har vist sig at korrelere med inflammationsniveauet og observerede overfladeskader, efterhånden som øjenirritationen udvikler sig.

Ved FL-forsøgsmetoden måles toksiske virkninger efter en kort eksponeringstid for testkemikaliets i form af en stigning i permeabiliteten af natriumfluorescein gennem epitelmonolaget af Madin-Darby-hundenyreceller (MDCK) dyrket på permeable indsatser. Størrelsen af den opståede fluoresceinudsivning er proportional med den kemikalie-inducerede beskadigelse af tight junctions, desmosomer og cellemembraner og kan anvendes til at vurdere et testkemikalies potentielle øjenætsende toksicitet. Tillæg 1 indeholder et diagram over MDCK-celler dyrket på en indsatsmembran til FL-forsøgsmetoden.

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

Definitioner findes i tillæg 2.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

Denne forsøgsmetode er baseret på INVITTOX-protokol nr. 71 (6), som er blevet evalueret i en international valideringsundersøgelse foretaget af Det Europæiske Center for Validering af Alternative Metoder (ECVAM) i samarbejde med US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) og Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM).

FL-forsøgsmetoden anbefales ikke til identifikation af kemikalier, der skal klassificeres som let/moderat øjenirriterende stoffer, eller til kemikalier, der ikke skal klassificeres som øjenirriterende (stoffer og blandinger) (dvs. GHS-kategori 2A/ 2B, uden for kategori, EU CLP-kategori 2, uden for kategori, US EPA-kategori II/III/IV), som fremgår af valideringsundersøgelsen (3) (7).

Forsøgsmetoden kan kun anvendes til vandopløselige kemikalier (stoffer og blandinger). Det stærkt øjenirriterende potentiale ved kemikalier, som er vandopløselige, og/eller hvis toksiske virkning ikke påvirkes af fortynding, forudsiges generelt nøjagtigt med FL-forsøgsmetoden (7). For at et kemikalie kan kategoriseres som vandopløseligt under forsøgsbetingelser, skal det være opløseligt i en steril calciumholdig (med en koncentration på 1,0-1,8 mM) phenolrødt-fri Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) i en koncentration på ≥ 250 mg/ml (en dosis over grænseværdien på 100 mg/ml). Men hvis testkemikalien er opløseligt under koncentrationen 100 mg/ml, men allerede inducerer en FL-induktion på 20 % ved denne koncentration (dvs. $FL_{20} < 100$ mg/ml), kan det stadig klassificeres som GHS-kategori 1 eller EPA-kategori I.

De konstaterede begrænsninger ved denne forsøgsmetode udelukker stærke syrer og baser, cellefiksativer og meget flygtige kemikalier fra anvendelsesområdet. Disse kemikalier har mekanismer, som ikke måles med FL-forsøgsmetoden, f.eks. kraftig koagulering, forsæbning eller specifikke reaktionsegenskaber. Andre identificerede begrænsninger for denne metode er baseret på resultaterne for forudsigelsesevnen for farvede og viskøse testkemikalier (7). Det anføres, at begge typer kemikalier er vanskelige at fjerne fra monolaget efter kortvarig eksponering, og at forsøgsmetodens forudsigelsesevne kan forbedres, hvis der anvendes et stort antal vaskninger. Faste kemikalier i suspension i væsker er tilbøjelige til at udfældes, og slutkoncentrationen i cellerne kan være vanskelig at fastslå. Når kemikalier i disse kemiske og fysiske stofgrupper udelukkes fra databasen, forbedres FL's nøjagtighed på tværs af EU-, EPA- og GHS-klassificeringssystemerne væsentligt (7).

Som følge af formålet med denne forsøgsmetode (dvs. alene identifikation af øjenætsende stoffer/stærkt øjenirriterende stoffer) er falsk negativ-raterne (jf. punkt 13) ikke kritiske, eftersom sådanne kemikalier efterfølgende vil blive testet med andre tilstrækkeligt validerede in vitro-test eller i kaniner, alt efter de forskriftsmæssige krav, med anvendelse af en sekventiel teststrategi med en "weight of evidence"-tilgang (5) (jf. også punkt 3 og 4).

Andre identificerede begrænsninger ved FL-forsøgsmetoden skyldes andelen af falsk negative og falsk positive resultater. Når andelen af falsk positive resultater blev anvendt som første trin i en top-down-metode til at identificere vandopløselige øjenætsende stoffer/stærkt øjenirriterende stoffer og blandinger (UN GHS-kategori 1, EU CLP-kategori 1, U.S. EPA-kategori I), varierede den ved FL-forsøgsmetoden fra 7 % (7/103, UN GHS og EU CLP) til 9 % (9/99, U.S. EPA), og andelen af falsk negative resultater varierede fra 54 % (15/28, U.S. EPA) til 56 % (27/48, UN GHS og EU CLP) sammenlignet med in vivo-resultater. Kemikaliegrupper, der udviser falsk positive og/eller falsk negative resultater i FL-forsøgsmetoden, defineres ikke her.

Visse tekniske begrænsninger er specifikke for MDCK-cellekulturen. De tight junctions, der blokerer natriumfluorescein-farvestoffets passage gennem monolaget, ødelægges stadig mere med et stigende antal cellegenerationer. Ufuldstændig dannelse af tight junctions resulterer i øget FL i den ikke-behandlede kontrol. Det er derfor vigtigt med en defineret tilladt maksimal udsivning i de ubehandlede kontroller (se punkt 38: 0 % udsivning). Som det er tilfældet med alle in vitro-assays, er det muligt, at cellerne forandres over tid, og derfor er det afgørende, at generationernes nummerserier for assays angives.

Det nuværende anvendelsesområde kan udvides i nogle tilfælde, men først efter analyse af et udvidet datasæt for de undersøgte testkemikalier, helst opnået gennem test (3). Denne forsøgsmetode vil blive opdateret efter behov, i takt med at nye oplysninger og data behandles.

Ethvert laboratorium bør, når det begynder at bruge dette assay, benytte kompetencekemikalierne i tillæg 3. Laboratorier kan benytte disse kemikalier til at godtgøre deres tekniske kompetence vedrørende brug af FL-forsøgsmetoden, inden de påbegynder fremsendelse af FL-assaydata med henblik på forskriftsmæssig fareklassificering.

PRINCIP FOR TESTEN

FL-forsøgsmetoden er et in vitro-assay baseret på cytotoxicitet og cellefunktion, der udføres på et sammenflydende monolag af rørformede MDCK CB997-epitelceller, der er dyrket på semipermeable indsatser, og som modellerer den ikke-formerende tilstand af cornea-epitelet in vivo. MDCK-cellelinjen er veletableret og danner tight junctions og desmosomer svarende til dem, der findes på den apikale side af conjunctiva- og cornea-epitel. Tight junctions og desmosomer in vivo forhindrer, at opløste stoffer og fremmede stoffer trænger ind i cornea-epitelet. Tab af trans-epitel-uigennemtrængelighed på grund af beskadigede tight junctions og desmosomer er en af de tidlige begivenheder ved kemikalieinduceret øjenirritation.

Testkemikalien påføres det sammenflydende lag af celler, der dyrkes på den apikale side af indsatsen. En kortvarig eksponering på 1 minut anvendes rutinemæssigt til at afspejle det normale tidsrum for menneskers eksponering. En fordel ved den korte eksponeringstid er, at vandbaserede stoffer og blandinger kan testes i ren form, såfremt de let kan fjernes efter eksponeringsperioden. Dette giver mulighed for mere direkte sammenligninger af resultaterne med de kemiske virkninger hos mennesker. Herefter fjernes testkemikalien, og det ikketoksiske, stærkt fluorescerende natriumfluorescein-farvestof påføres den apikale side af monolaget i 30 minutter. Skaden, som testkemikalien forårsager på tight junctions, bestemmes af mængden af fluorescein, der siver gennem cellelaget inden for en nærmere afgrænset periode.

Mængden af natriumfluorescein-farvestoffet, der passerer gennem monolaget og indsatsmembranen i en bestemt mængde af opløsningen i brønden (som natriumfluorescein-farvestoffet siver ud i) bestemmes ved spektrofotometrisk måling af fluoresceinkoncentrationen i brønden. Størrelsen af fluorescein-udsivningen (FL) beregnes i forhold til fluorescensintensitets- (FI) aflæsningerne fra to kontroller: en blindprøve og en kontrol for den maksimale udsivning. Den procentvise udsivning og dermed omfanget af skaden på tight junctions angives i forbindelse med disse kontroller for hver af de fastlagte koncentrationer af testkemikalien. Derefter beregnes FL₂₀ (dvs. den koncentration, der forårsager 20 % FL i forhold til den værdi, der registreres for det ubehandlede, sammenflydende enkeltlag og indsatser uden celler). Værdien FL₂₀ (mg/ml) bruges i forudsigelsesmodellen til identifikation af øjenætsende stoffer og stærkt øjenirriterende stoffer (se punkt 35).

Restitutionen er en vigtig del af et testkemikalies toksicitetsprofil, som også vurderes ved hjælp af in vivo-testen af øjenirritation. Foreløbige analyser viste, at restitutionsdata (op til 72 timer efter kemikalieeksponeringen) vil kunne vanskeliggøre forudsigelsesevnen for INVITTOX Protocol 71, men der er behov for yderligere evaluering, og det vil være hensigtsmæssigt med flere data, helst opnået ved yderligere test (6). Denne forsøgsmetode vil blive opdateret efter behov, i takt med at nye oplysninger og data behandles.

FREM GANGSMÅDE

Præparering af cellemonolaget

Monolaget af MDCK CB997-celler præpareres med sub-konfluente celler dyrket i celledyrkningskolber i DMEM/næringsstofblandingen F12 (1x-koncentrat med L-glutamin, 15 mM HEPES, calcium (i en koncentration på 1,0-1,8 mM) og 10 % varme-inaktiverede FCS/FBS). Det er vigtigt, at alle medier/opløsninger, der anvendes i hele FL-assayet, indeholder calcium i en koncentration på mellem 1,8 mM (200 mg/l) og 1,0 mM (111 mg/l) for at sikre dannelse af tight junctions og disses integritet. Intervallet af cellegenerationer bør kontrolleres for at sikre ensartet og reproducerbar dannelse af tight junctions. Cellerne skal helst ligge inden for generationsintervallet 3-30 efter opretning, fordi celler i dette generationsinterval har en ensartet funktionalitet, hvilket gør det nemmere at reproducere analyseresultaterne.

Før FL-forsøgsmetoden anvendes, adskilles celler fra kolben ved trypsinering og centrifugeres, hvorefter en passende mængde celler podes på indsætter, der er anbragt i plader med 24 brønde (se tillæg 1). 12 mm indsætter med en membran af blandede celluloseestere, en tykkelse på 80-150 µm og en porestørrelse på 0,45 µm anvendes til udsåning af cellerne. I valideringsundersøgelsen benyttede man Millicell-HA 12 mm-indsætter. Indsættens egenskaber og membrantypen er vigtige, da disse kan påvirke cellevæksten og kemikaliebindingen. Visse typer af kemikalier kan binde sig til Millicell-HA-indsættens membran, hvilket kan få indflydelse på fortolkningen af resultaterne. Kompetencekemikalier (se tillæg 3) bør anvendes til at påvise ækvivalensen, hvis der anvendes andre membraner.

Kemikaliebinding til indsættens membran er mere almindelig for kationiske kemikalier som benzalkoniumchlorid, der tiltrækkes af den ladede membran (7). Kemisk binding til indsættens membran kan øge den kemiske eksponeringsperiode og føre til en overvurdering af kemikaliet's toksiske potentiale, men kan også fysisk reducere udsivningen af fluorescein gennem indsættens ved at binde farvestoffet til det kationiske kemikalie, der er bundet til indsættens membran, hvilket vil føre til en undervurdering af kemikaliet's toksiske potentiale. Dette kan let kontrolleres ved kun at eksponere membranen for den højeste koncentration af det testede kemikalie og herefter tilføje farvestoffet natriumfluorescein i den normale koncentration i standardtidsrummet (ingen cellekontrol). Hvis der indtræder binding af natriumfluorescein-farvestoffet, får indsættens membran en gul farve, når testmaterialet er vasket af. Det er derfor vigtigt kende testkemikaliet's bindingsegenskaber for at kunne fortolke kemikaliet's indvirkning på cellerne.

Cellepodning på indsætterne skal frembringe et sammenflydende monolag på tidspunktet for den kemiske eksponering. $1,6 \times 10^5$ celler tilføjes pr. indsæt (400 µl af en celledensitet med en densitet på 4×10^5 celler/ml). Under disse omstændigheder opnås et sammenflydende monolag normalt efter 96 timers dyrkning. Indsætterne bør undersøges visuelt før podning for at sikre, at eventuelle skader, der konstateres ved den visuelle kontrol, som beskrives i punkt 30, skyldes håndtering.

MDCK-cellekulturer bør opbevares i inkubatorer i en fugtig atmosfære ved $5\% \pm 1\% \text{ CO}_2$ og $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Cellerne skal være fri for kontamination med bakterier, virus, mykoplasma og svampe.

Påføring af test- og kontrolkemikalier

Der fremstilles en ny stamopløsning af testkemikaliet til hvert forsøg, og den bør anvendes inden for 30 minutter efter fremstillingen. Testkemikalierne præpareres i en calciumholdig (med en koncentration på 1,0-1,8 mM), phenolrødt-fri HBSS for at undgå proteinbinding i serummet. Kemikaliet's opløselighed ved 250 mg/ml i HBSS vurderes inden testen. Hvis kemikaliet danner en stabil suspension eller emulsion (dvs. bevarer ensartetheden og ikke bundfældes eller skilles i mere end en fase) i løbet af 30 minutter ved denne koncentration, kan HBSS stadig bruges som opløsningsmiddel. Men hvis det viser sig, at kemikaliet er uopløseligt i HBSS ved denne koncentration, bør man overveje at anvende andre forsøgsmetoder i stedet for FL. Brugen af let mineralolie som opløsningsmiddel i de tilfælde, hvor det viser sig, at kemikaliet er uopløseligt i HBSS, bør ske med forsigtighed, da der ikke foreligger tilstrækkelige data til at udlede konklusioner vedrørende FL-assayets ydeevne under sådanne forhold.

Alle kemikalier, der skal testes, præpareres i en steril calciumholdig (med en koncentration på 1,0-1,8 mM), phenolrødt-fri HBSS fra stamopløsningen i fem fastlagte koncentrationer fortyndet efter volumenvægt: 1, 25, 100, 250 mg/ml og en ren eller en mættet opløsning. Ved test af et fast kemikalie medtages der en meget høj koncentration på 750 mg/ml. Denne koncentration af kemikaliet skal muligvis påføres cellerne med en pipette med positiv fortrængning. Hvis det konstateres, at toksiciteten ligger mellem 25 og 100 mg/ml, bør følgende yderligere koncentrationer testes to gange: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. FL_{20} -værdien udledes af disse koncentrationer, hvis acceptkriterierne er opfyldt.

Testkemikalierne tilsættes de sammenflydende cellemonolag efter fjernelse af dyrkningsmediet og to gange vask med sterilt, varmt (37 °C) calciumholdig (med en koncentration på 1,0-1,8 mM) phenolrødt-fri HBSS. Forinden er filtrene kontrolleret visuelt for alle eksisterende skader, der fejlagtigt kunne tilskrives potentiel uforenelighed med testkemikalierne. Der anvendes mindst tre replikater for hver koncentration af testkemikaliets og til kontrollerne i hver kørsel. Efter 1 minuts eksponering ved stuetemperatur fjernes testkemikaliets forsigtigt ved opsugning, monolaget vaskes to gange med steril, varm (37 °C) calciumholdig (med en koncentration på 1,0-1,8 mM) phenolrødt-fri HBSS, og fluoresceinudsivningen måles med det samme.

Samtidige negative (NC) og positive kontroller (PC) bruges til at påvise, at monolagets integritet (NC) og cellernes følsomhed (PC) ligger inden for et forudfastsat acceptinterval. Det foreslåede PC-kemikalie er Brij 35 (CAS-nr. 9002-92-0) ved 100 mg/ml. Denne koncentration giver en fluoresceinudsivning på omkring 30 % (acceptabelt interval 20-40 % fluoresceinudsivning, dvs. skader på celleglaget). Det foreslåede NC-kemikalie er calciumholdig (med en koncentration på 1,0-1,8 mM), phenolrødt-fri HBSS (ubehandlet, blindprøve). Der medtages også en maksimal udsivning i hver kørsel for at gøre det muligt at beregne FL₂₀-værdier. Den maksimale udsivning bestemmes ved hjælp af en kontrolindsats uden celler.

Bestemmelse af fluoresceinpermeabilitet

Umiddelbart efter fjernelse af test- og kontrolkemikalierne tilsættes 400 µl 0,1 mg/ml-fluoresceinopløsning (0,01 % (vægt/volumen) i calciumholdig [i en koncentration på 1,0-1,8 mM], phenolrødt-fri HBSS) til indsatserne (f.eks. Millicell-HA). Kulturerne opbevares ved stuetemperatur i 30 minutter. Ved afslutningen af inkuberingen med fluorescein fjernes indsatserne forsigtigt fra hver brønd. Der foretages visuel kontrol af hvert filter, og eventuelle skader, der måtte være opstået under håndteringen, registreres.

Mængden af fluorescein, der er sevet gennem monolaget og indsatsen, bestemmes i den opløsning, som blev tilbage i brøndene efter fjernelse af indsatserne. Målingerne foretages i et spektrofluorometer ved excitations- og emissionsbølgelængder på henholdsvis 485 nm og 530 nm. Spektrofluorometerets følsomhed indstilles, så man opnår den højeste numeriske forskel mellem det maksimale FL (indsats uden celler) og det minimale FL (indsats med sammenflydende monolag behandlet med NC). På grund af forskelle mellem de anvendte spektrofluorometre anbefales det at anvende en følsomhed, som giver en fluorescensintensitet > 4 000 ved kontrol af den maksimale fluoresceinudsivning. Den maksimale FL-værdi må ikke være højere end 9 999. Den maksimale intensitet af fluorescensudsivningen bør ligge inden for det anvendte spektrofluorometers lineære rækkevidde.

Fortolkning af resultater og forudsigelsesmodel

Mængden af FL er proportional med de kemikalieinducerede skader på tight junctions. FL-procenten for hver af de testede koncentrationer af kemikaliets beregnes ud fra de opnåede FL-værdier for testkemikaliets med henvisning til FL-værdier fra NC (aflæsning for sammenflydende monolag af celler behandlet med NC) og kontrollen for den maksimale udsivning (aflæsning for FL-mængden gennem en indsats uden celler).

Den gennemsnitlige maksimale fluorescensintensitet = x

Den gennemsnitlige maksimale procentvise fluorescensintensitet (NC) = y

Den gennemsnitlige 100 %-udsivning opnås ved at trække den gennemsnitlige 0 %-udsivning fra den gennemsnitlige maksimale udsivning,

dvs. $x - y = z$

Den procentvise udsivning for hver af de fastsatte doser opnås ved at trække 0 %-udsivningen fra den gennemsnitlige fluorescensintensitet for de tre replikataflæsninger (m) og dividere denne værdi med 100 %-udsivningen, dvs. $\% FL = [(m-y) / z] \times 100 \%$, hvor:

m = middelværdien for fluorescensintensiteten for de tre replikatmålinger for den pågældende koncentration

% FL = procentdelen af fluorescein, der siver gennem cellelaget

Følgende ligning til beregning af den kemiske koncentration, der forårsager 20 % FL, anvendes:

$$FL_D = [(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

hvor

D = % hæmning

A = % skader (20 % fluoresceinudsivning)

B = % fluoresceinudsivning < A

C = % fluoresceinudsivning > A

M_C = koncentration (mg/ml) af C

M_B = koncentration (mg/ml) af B

Tærskelværdien for FL₂₀ for forudsigelse af, hvorvidt kemikalier er øjenætsende/stærkt øjenirriterende er anført nedenfor:

FL ₂₀ (mg/ml)	UN GHS C&L	EU CLP C&L	U.S. EPA C&L
≤ 100	Kategori 1	Kategori 1	Kategori I

C&L: klassificering og mærkning

FL-forsøgsmetoden anbefales kun til identifikation af vandopløselige øjenætsende stoffer og stærkt øjenirriterende stoffer (UN GHS-kategori 1, EU CLP-kategori 1, U.S. EPA-kategori I) (se punkt 1 og 10).

Med henblik på at identificere vandopløselige kemikalier (stoffer og blandinger) (3) (6) (7), som "medfører alvorlig øjenskade" (UN GHS/EU CLP-kategori 1), eller som er "øjenætsende eller stærkt øjenirriterende" (U.S. EPA-kategori I), skal testkemikallet inducere en FL₂₀-værdi på ≤ 100 mg/ml.

Accept af resultater

Den gennemsnitlige maksimale værdi for fluoresceinudsivning (x) skal være højere end 4 000 (se punkt 31), den gennemsnitlige 0 %-udsivning (y) skal være mindre end eller lig med 300, og 100 %-udsivningen (z) skal ligge mellem 3 700 og 6 000.

En test anses for acceptabel, hvis den positive kontrol medførte 20 % til 40 % skade på cellelaget (målt som % fluoresceinudsivning).

DATA OG RAPPORTERING

Data

For hver analyseserie bør data fra de enkelte replikatbrønde (f.eks. værdier for fluorescensaktivitet og beregnede procentvise FL-data for hvert testkemikalie samt dets klassificering) fremlægges i tabelform. Desuden bør gennemsnit og standardafvigelse for individuelle gentagne målinger i hver kørsel rapporteres.

Testrapport

Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Test- og kontrolkemikalier

- kemisk(e) navn(e) såsom det strukturnavn, der anvendes af Chemical Abstracts Service (CAS), efterfulgt af andre navne, hvis sådanne kendes
- kemikaliets CAS-nummer, hvis dette er kendt
- renhed og sammensætning af stoffet eller blandingen (i vægtprocent) i det omfang, disse oplysninger er tilgængelige
- fysisk-kemiske egenskaber, som er relevante for undersøgelsen (f.eks. fysisk tilstand, flygtighed, pH, stabilitet, opløselighed i vand, kemikaliegruppe)
- eventuel behandling af test-/kontrolkemikalier inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)
- opbevaringsforhold.

Begrundelse for den anvendte forsøgsmetode og protokol

- bør indeholde overvejelser vedrørende anvendelsesområde og forsøgsmetodens begrænsninger.

Testbetingelser

- beskrivelse af det anvendte cellesystem, herunder ægthedscertifikatet og mycoplasmastatus for cellelinjen
- detaljer om den anvendte testprocedure
- de(n) anvendte koncentration(er) af testkemikali
- varighed af eksponering for testkemikali
- varighed af inkuberingen med fluorescein
- beskrivelse af eventuelle ændringer i testproceduren
- beskrivelse af de anvendte vurderingskriterier
- reference til historiske data for modellen (f.eks. negative og positive kontroller, referencekemikalier, hvis dette er relevant)
- oplysninger om den tekniske kompetence, som laboratoriet har dokumenteret.

Resultater

- Opstilling i tabelform af data for hvert enkelt testkemikalie, for kontrollerne i hver kørsel og fra hver flergangsbestemmelse (inklusive individuelle resultater, gennemsnit og standardafvigelser)
- de(n) afledte klassificering(er) med henvisning til den anvendte forudsigelsesmodel og/eller beslutningskriterier
- beskrivelse af andre observerede virkninger.

Diskussion af resultaterne

- Bør omfatte overvejelser vedrørende et usikkert resultat (punkt 35: FL₂₀ > 100 mg/ml) og yderligere undersøgelser

Konklusioner

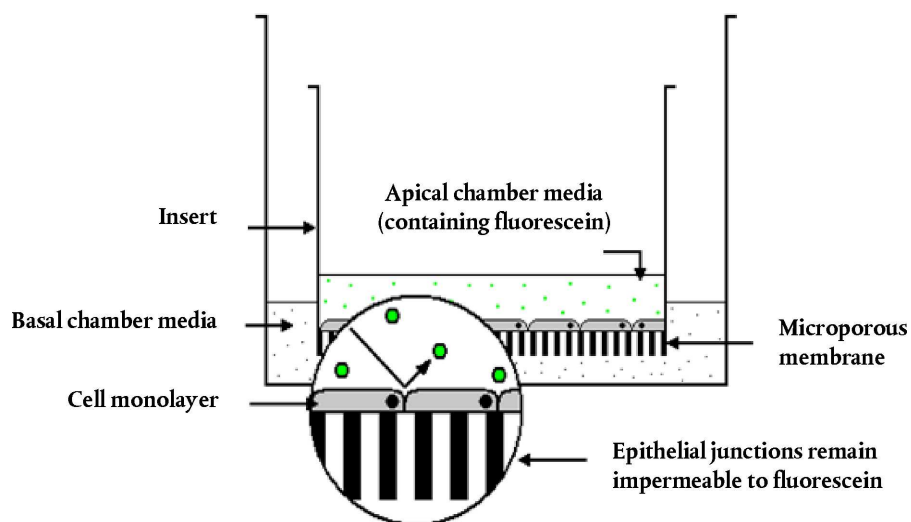
LITTERATUR

- (1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1 Tilgængelig på: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html
 - (2) U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
 - (3) EC-ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing.
 - (4) 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
 - (5) Kapitel B.5 i dette bilag, Akut øjenirritation/-ætsning.
 - (6) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Tilgængelig på: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>]
 - (7) EC-ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.
 - (8) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment No. 34, OECD, Paris. OECD, Paris.
-

Tillæg 1

DIAGRAM OVER MDCK-CELLER DYRKET PÅ EN INDSATSMEMBRAN TIL FL-FORSØGSMETODEN

Et sammenflydende lag MDCK-celler dyrkes på en semipermeabel membran fra en indsats. Indsatserne placeres i plader med 24 brønde.



Figur hentet fra: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph. D. Thesis, University of Nottingham, UK.

Tillæg 2

DEFINITIONER

Nøjagtighed: Overensstemmelsen mellem forsøgsmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for forsøgsmetodens ydeevne og et af aspekterne af »relevans«. Udtrykket benyttes ofte som synonym for »konkordans«, forstået som den andel af korrekte udfald, forsøgsmetoden fører til.

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

EPA-kategori I: Kemikalier, der forårsager ætsende virkning (irreversibel ødelæggelse af øjenvæv) eller cornea-beskadigelse eller -irritation, som persisterer i mere end 21 dage (2).

EU CLP (forordning (EF) nr. 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger): Gennemfører FN's globalt harmoniserede system for klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) (GHS) i Den Europæiske Union (EU).

Falsk negativ-rate: Den andel af alle positive kemikalier, som ved en forsøgsmetode fejlagtigt identificeres som negative. Dette er en indikator for forsøgsmetodens ydeevne.

Falsk positiv-rate: Den andel af alle negative kemikalier, som ved en forsøgsmetode fejlagtigt identificeres som positive. Dette er en indikator for forsøgsmetodens ydeevne.

FL₂₀: Kan vurderes ved bestemmelse af den koncentration, hvor testkemikallet forårsager 20 % af fluoresceinudsivningen gennem cellelaget.

Fluoresceinudsivning: Mængden af fluorescein, der passerer gennem cellelaget, målt med spektrofluorometri.

De Forenede Nationers (FN) globalt harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (GHS): System til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, risikosætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljø.

GHS-kategori 1: Frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsettelse, som opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter påføring.

Fare: Den iboende egenskab ved et middel eller en situation, som kan forårsage skade, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende middel.

Blanding: Brugt i forbindelse med UN GHS som en blanding eller opløsning, der er sammensat af to eller flere stoffer, hvori de ikke reagerer.

Negativ kontrol: Et ubehandlet replikat, som indeholder alle komponenter fra et testsystem. Prøven behandles sammen med prøver behandlet med testkemikallet og andre kontrolprøver for at afgøre, hvorvidt opløsningsmidlet interagerer med testsystemet.

Ikke klassificeret: Kemikalier, der ikke er klassificeret som øjenirriterende stoffer i UN GHS-kategori 1, 2A eller 2B, EU CLP-kategori 1 eller 2 eller U.S. EPA-kategori I, II eller III.

Øjenætsende stof: a) kemikalie, der forårsager irreversibel vævsbeskadigelse i øjet; b) kemikalier, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i UN GHS-kategori 1, EU CLP-kategori 1 eller U.S. EPA-kategori I.

Øjenirriterende stof: a) kemikalie, der frembringer en reversibel ændring i øjet efter påføring på øjets anteriore overflade; b) kemikalier, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i UN GHS-kategori 2A eller 2B, EU CLP-kategori 2 eller U.S. EPA-kategori, II eller III.

Stærkt øjenirriterende stof: a) kemikalie, som forårsager vævsbeskadigelse i øjet efter påføring på øjets anteriore overflade, som ikke er reversibel inden for 21 dage efter påføring, eller som forårsager alvorlig fysisk synsnedsettelse; b) kemikalier, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i UN GHS-kategori 1, EPA-kategori I, EU CLP-kategori 1 eller U.S. EPA-kategori I.

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

Kompetencekemikalier: Undergruppe af listen over referencekemikalier, der kan anvendes af et uerfarent laboratorium til at dokumentere fortrolighed med den validerede forsøgsmetode.

Relevans: Beskrivelse af sammenhængen mellem testen og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang testen måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Forsøgsmetodens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dens relevans (8).

Pålidelighed: Mål for, i hvilken grad en forsøgsmetode kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og repeterbarhed inden for laboratorier.

Erstatningstest: Test, der erstatter en test, som bruges rutinemæssigt og er godkendt til fareidentifikation og/eller risikovurdering, og som vurderes at sikre en tilsvarende eller bedre beskyttelse af menneskers og dyrs sundhed eller miljøet alt afhængigt af situationen i forhold til den godkendte test, i alle testsituationer og for alle kemikalier.

Følsomhed: Andel af alle positive/aktive kemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Det er et mål for nøjagtigheden af en forsøgsmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en forsøgsmetodes relevans (8).

Alvorlig øjenskade: Frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsettelse, som opstår efter påføring af et testkemikalie på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter påføring.

Opløsningsmiddel-/bærestofkontrol: Ubehandlet prøve, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem, herunder opløsningsmidlet eller bærestoffet, og som behandles sammen med de testkemikaliebehandlede prøver og andre kontrolprøver for at fastlægge basisresponsen for de prøver, som er behandlet med testkemikaliets opløst i det samme opløsningsmiddel eller bærestof. Når denne prøve testes med en samtidig negativ kontrol, viser den også, hvorvidt opløsningsmidlet eller bærestoffet interagerer med testsystemet.

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

Stof: Anvendes i forbindelse med UN GHS om grundstoffer og forbindelser heraf, naturlige eller industrielt fremstillede, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, som kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning.

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

Trindelt teststrategi: Ved anvendelse af den trinvis teststrategi gennemgås alle eksisterende oplysninger om et testkemikalie i en bestemt rækkefølge ved anvendelse af en weight-of-the-evidence-proces på hvert trin for at fastslå, om der foreligger tilstrækkelige oplysninger til at træffe en fareklassificeringsafgørelse, inden der fortsættes til næste trin. Hvis et testkemikalies irritationspotentiale kan underbygges baseret på eksisterende oplysninger, er der ikke behov for at foretage yderligere test. Hvis et testkemikalies irritationspotentiale ikke kan underbygges baseret på eksisterende oplysninger, foretages en trindelt sekventiel dyreforsøgsprocedure, indtil der kan foretages en utvetydig klassificering.

Valideret forsøgsmetode: En forsøgsmetode, for hvilken der er gennemført valideringsundersøgelser for at fastslå relevansen (herunder nøjagtigheden) og pålideligheden til et bestemt formål. Det er vigtigt at være opmærksom på, at en valideret forsøgsmetode måske ikke har tilstrækkelig ydeevne med hensyn til nøjagtighed og pålidelighed til at være acceptabel til det planlagte formål (8).

»**Weight-of-the-evidence**«: Proces, hvor styrkerne og svaghederne ved forskellige oplysninger afvejes for at nå frem til og underbygge en konklusion om et stofs farepotentiale.

Tillæg 3

KOMPETENCEKEMIKALIER TIL FL-FORSØGSMETODEN

Inden laboratorier påbegynder rutinemæssig brug af denne forsøgsmetode, bør de godtgøre deres tekniske kompetence ved korrekt identifikation af øjenætsningsklassificeringen for de otte anbefalede kemikalier i tabel 1. Disse kemikalier er udvalgt således, at de repræsenterer det responsområde for lokal øjenirritation/-ætsning, som er baseret på resultater fra in vivo-kaninøjentesten (TG 405, TM B.5(5)) (dvs. stoffer, der befinder sig i UN GHS-kategori 1, 2A, 2B eller uden for klassificering). Hvad angår den validerede anvendelighed af FL-assayet (dvs. alene til identifikation af øjenætsende stoffer/stærkt øjenirriterende stoffer), er der imidlertid kun to testudfald i relation til klassificering (ætsende stof/stærkt irriterende stof eller ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof), hvormed kompetencen kan godtgøres. Andre udvælgelseskriterier er, at kemikalierne er kommercielt tilgængelige, at der foreligger tilgængelige in vivo-referencedata af høj kvalitet, og at der findes data af høj kvalitet for FL-forsøgsmetoden. Derfor blev kompetencekemikalierne udvalgt fra »Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing« (8), som blev anvendt til den retrospektive validering af FL-forsøgsmetoden.

Tabel 1

Anbefalede kemikalier til godtgørelse af teknisk kompetence i anvendelsen af FL

Kemikalie	CASNR	Kemikaliegruppe ⁽¹⁾	Fysisk form	In vivo-klassificering ⁽²⁾	In vitro-klassificering ⁽³⁾
Benzalkoniumchlorid (5 %)	8001-54-5	Oniumforbindelse	Flydende	Kategori 1	Ætsende stof/stærkt irriterende stof
Promethazinhydrochlorid	58-33-3	Amin/amidin, heterocyklisk organisk svovlforbindelse	Fast	Kategori 1	Ætsende stof/stærkt irriterende stof
Natriumhydroxid (10 %)	1310-73-2	Alkali	Flydende	Kategori 1	Ætsende stof/stærkt irriterende stof
Natriumlaurylsulfat (15 %)	151-21-3	Carboxylsyre (salt)	Flydende	Kategori 1	Ætsende stof/stærkt irriterende stof
4-carboxy-benzaldehyd	619-66-9	Carboxylsyre, aldehyd	Fast	Kategori 2(A)	Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof
Ammoniumnitrat	6484-52-2	Uorganisk salt	Fast	Kategori 2(A)	Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof
Ethyl-2-methylacetoacetat	609-14-3	Keton, ester	Flydende	Kategori 2(B)	Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof
Glycerol	56-81-5	Alkohol	Flydende	Uden for kategori	Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof

Forkortelser: CASNR = Chemical Abstracts Service Registry Number

⁽¹⁾ Kemikaliegrupperne for hvert testkemikalie blev fastsat ved anvendelse af et standardklassificeringsskema baseret på National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH)-klassificeringssystemet (se følgende websted: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>)

⁽²⁾ Baseret på resultater fra in vivo-kaninøjentesten (OECD TG 405, TM B.5) og brug af UN GHS og EU CLP.

⁽³⁾ Baseret på resultater, der er opnået med FL (INVITOX protokol nr. 71(6))

B. 62 Alkalisk in vivo-kometassay med pattedyr**INDLEDNING**

Denne forsøgsmetode svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline (TG)) 489 (2016). Det alkaliske in vivo-kometassay (gelelektroforese på enkeltceller — i det følgende blot benævnt kometassayet) anvendes til at konstatere brud på DNA-strengene i celler eller kerner, der er isoleret fra flere vævstyper fra dyr, sædvanligvis gnavere, der har været eksponeret for potentielt genotoksisk(e) materiale(r). Kometassayet er blevet gennemgået af forskellige ekspertgrupper, som også har fremsat anbefalinger (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). Denne forsøgsmetode er en del af en række forsøgsmetoder vedrørende genetisk toksikologi. Der er udarbejdet et OECD-dokument med kortfattede oplysninger om test af genetisk toksikologi og en oversigt over de nylige ændringer af denne testvejledning (11).

Formålet med kometassayet er at identificere kemikalier, der forårsager DNA-skader. I et basisk miljø (> pH 13) kan kometassayet registrere brud på enkelt- og dobbeltstrengene, der f.eks. skyldes direkte interaktion med DNA, alkalilabile steder eller en række forbigående brud på DNA-strengene som følge af reparation af DNA-overskæring. Disse brud på strengene kan repareres, hvilket betyder, at der ikke opstår nogen vedvarende virkning, kan være dødelige for cellen eller kan repareres til en mutation, der medfører en permanent, men dog levedygtig forandring. De kan også føre til kromosomskader, som ligeledes er forbundet med mange sygdomme hos mennesker, herunder kræft.

Et formelt valideringsforsøg af in vivo-kometassayet for gnavere blev udført i 2006-2012 og blev koordineret af Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) sammen med Det Europæiske Center for Validering af Alternative Metoder (ECVAM), Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) og NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) (12). Forsøgsmetoden omfatter kometassayets anbefalede anvendelse og begrænsninger og er baseret på den endelige protokol (12), der anvendes ved valideringstesten, og på yderligere relevante offentliggjorte og ikke-offentliggjorte data (som tilhører laboratorier).

Definitioner af nøgletermer findes i tillæg 1. Det bemærkes, at mange forskellige platforme kan bruges til dette assay (objektglas, gelpletter, plader med 96 brønde osv.). For nemheds skyld anvendes betegnelsen "objektglas" i hele den resterende del af dette dokument, men det omfatter alle de øvrige platforme.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

Kometassayet er en metode til måling af brud på DNA-strengene i eukaryote celler. Enkeltceller/-kerner indlejret i agarose på et objektglas lyseres med et rengøringsmiddel og høj saltkoncentration. Ved dette lyseringstrin fjernes celle- og kernemembranerne, hvilket giver mulighed for frigivelse af DNA-spiraler, normalt kaldet nukleoider, og DNA-fragmenter. Elektroforese ved høj pH skaber strukturer, der ligner kometer, og som ved hjælp af hensigtsmæssig fluorescerende farvning kan observeres ved fluorescensmikroskopi; DNA-fragmenterne bevæger sig væk fra "hovedet" og ned i "halen" i henhold til deres størrelse, og komethalens intensitet i forhold til den samlede intensitet (hoved plus hale) afspejler omfanget af DNA-brud (13) (14) (15).

Det basiske in vivo-kometassay er særlig relevant til vurdering af genotoksisk fare, idet assayets respons afhænger af in vivo-ADME (absorption, distribution, metabolisme og ekskretion), og ligeledes af DNA-reparationsprocesserne. Disse kan variere mellem arter, væv og typerne af DNA-skader.

For at opfylde kravene til dyrevelfærd, navnlig reduktionen i brugen af forsøgsdyr (princippet om de tre R'er — Replacement, Reduction, Refinement), kan dette assay også integreres med andre toksikologiske undersøgelser, f. eks. undersøgelser af toksicitet ved gentagen dosis (10) (16) (17), eller endepunktet kan kombineres med andre genotoksicitetsendepunkter, f.eks. in vivo-assayet for mikrokernetest i erythrocytter hos pattedyr (18) (19) (20). Kometassayet udføres oftest på gnavere, selv om det også har været anvendt på andre arter af både pattedyr og ikkepattedyr. Brug af arter, der ikke er gnavere, bør begrundes videnskabeligt og etisk i hvert enkelt tilfælde, og det anbefales på det kraftigste, at kometassayet kun udføres på andre arter end gnavere som et led i en anden toksicitetsundersøgelse og ikke som en selvstændig test.

Udvælgelse af eksponeringsvej og de vævstyper, der skal undersøges, bør fastlægges på grundlag af al foreliggende/eksisterende viden om testkemikalierne, f.eks. tilsigtet/forventet eksponeringsvej for mennesker, metabolisme og fordeling, potentiale for virkninger på kontaktstedet, strukturelle alarmer, andre data for genotoksicitet eller toksicitet samt formålet med forsøget. Når det er relevant, kan man undersøge kemikaliernes genotoksiske potentiale i målvæv/målvævene med hensyn til kræftfremkaldende og/eller andre toksiske virkninger. Assayet betragtes også som nyttigt til yderligere undersøgelse af genotoksicitet, der konstateres i et in vitro-system. Det er hensigtsmæssigt at udføre et in vivo-kometassay i et væv af interesse, når man med rimelighed kan forvente, at eksponeringen af det pågældende væv vil være tilstrækkelig.

Assayet er blevet valideret mest grundigt i somatisk væv fra hanrotter i ringtest, såsom JaCVAM-forsøg (12) og i Rothfuss et al., 2010 (10). Lever og mavesæk blev anvendt i den internationale JaCVAM-valideringstest. Leveren, fordi den er det mest aktive organ ved fordøjelsen af kemikalier og ofte også et målorgan for carcinogenicitet. Mavesækken, fordi det er normalt første kontaktsted for kemikalier ved oral eksponering, selv om andre områder i mave-tarmkanalen såsom duodenum og jejunum også bør betragtes som kontaktsteds væv og kan anses for mere relevante for mennesker end gnaveres kirtelmaver. Det bør sikres, at sådant væv ikke udsættes for uforholdsmæssigt høje koncentrationer af testkemikaliets (21). Teknikken gælder i princippet for alt væv, som kan bruges til at udlede analyserbare enkeltcelle/-kernesuspensioner. Proprietære data fra flere laboratorier viser, at den kan anvendes til mange forskellige slags væv med gode resultater, og mange publikationer viser teknikens anvendelighed til andre organer eller andet væv end lever og mavesæk, f.eks. jejunum (22), nyre (23) (24), hud (25) (26) eller urinblære (27) (28), lunger og udskyllede bronchoalveolære celler (relevant for undersøgelser af inhalerede kemikalier) (29) (30), og der er desuden foretaget test af flere organer (31) (32).

Selv om der kan være interesse i genotoksiske virkninger i kimceller, skal det bemærkes, at det basiske standardkometassay som beskrevet i denne forsøgsmetode ikke anses for hensigtsmæssigt til måling af DNA-strengbrud i modne kønsceller. Eftersom der blev rapporteret om høje og variable baggrunds niveauer i DNA-skader ved en gennemgang af litteraturen om brug af kometassayet til kimcelle-genotoksicitet (33), anses det for nødvendigt med protokolændringer kombineret med forbedret standardisering og valideringsundersøgelser, før kometassayet på modne kønsceller (f.eks. sæd) kan indgå i forsøgsmetoden. Desuden er den anbefalede eksponering, der beskrives for denne forsøgsmetode, ikke optimal, og der er behov for længere eksponerings- eller prøveudtagningstider for at nå frem til en meningsfuld analyse af DNA-strengbrud i modne sædceller. Genotoksiske virkninger, som måles med kometassayet i testikelcellerne på forskellige differentieringsstadier, findes beskrevet i litteraturen (34) (35). Det skal dog bemærkes, at gonader indeholder en blanding af somatiske celler og kimceller. Derfor afspejler positive resultater i hele gonaden (testis) ikke nødvendigvis kimcelleskader, men de indikerer ikke desto mindre, at de(t) testede kemikalie(r) og/eller dets metabolitter har nået gonaden.

Man kan ikke pålideligt påvise krydsforbindelser med standardforsøgsbetingelserne for kometassayet. Ved visse ændrede forsøgsbetingelser kan man muligvis konstatere DNA-DNA- og DNA-protein-krydsforbindelser og andre baseændringer såsom oxiderede baser (23) (36) (37) (38) (39). Der er imidlertid behov for yderligere undersøgelser for at nå frem til en korrekt karakterisering af de nødvendige protokolændringer. Dermed er påvisning af krydsforbindelsesfaktorer ikke det primære formål med assayet som beskrevet her. Assayet er ikke egnet til at identificere auegener, selv ikke efter ændringerne.

På baggrund af det aktuelle videnniveau er der adskillige yderligere begrænsninger (se tillæg 3) forbundet med in vivo-kometassayet. Det forventes, at forsøgsmetoden vil blive revideret på et senere tidspunkt og om nødvendigt ændret på baggrund af de indhøstede erfaringer.

Før brug af forsøgsmetoden til lovmæssig test af en blanding til generering af data bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.

METODENS PRINCIP

Dyrene eksponeres for testkemikaliets på passende vis. Punkt 36-40 indeholder en detaljeret beskrivelse af dosering og prøveudtagning. På de(t) valgte prøveudtagningstidspunkt(er) fridissekeres vævet af interesse, og der fremstilles suspensioner af celler/kerner (in situ-perfusion kan udføres, når det anses for nyttigt, f.eks. lever), som indlejres i blod agar for at immobilisere dem på objektglassene. Cellerne/kernerne behandles med lysisbuffer for at fjerne celle- og/eller kernemembranen og udsættes for en stærk base (f.eks. $\text{pH} \geq 13$) med henblik på at udfolde DNA'et og frigive udrettede DNA-spiraler og -fragmenter. Kernens DNA i agaret udsættes herefter for elektroforese. Almindelige ikke-fragmenterede DNA-molekyler forbliver i den position, som kernens DNA havde i agaret, mens eventuelt fragmenteret DNA og udrettede DNA-spiraler vil vandre mod anoden. Efter elektroforese undersøges DNA'et visuelt ved hjælp af en hensigtsmæssig fluorescerende farvning. Præparater bør analyseres med mikroskop og fuld- eller halvautomatiske billedanalyzesystemer. Mængden af DNA, der er vandret under elektroforesen, og den vandrede afstand afspejler antallet og størrelsen af DNA-fragmenterne. Der findes adskillige endepunkter for kometassayet. DNA-indholdet i halen (den procentvise DNA-intensitet i komethalen eller procentvise haleintensitet) anbefales til brug ved vurdering af DNA-skaderne (12) (40) (41) (42). Efter analyse af et tilstrækkeligt antal kerner analyseres dataene med hensigtsmæssige metoder for at vurdere resultaterne af assayet.

Det skal bemærkes, at man har undersøgt ændringer af forskellige aspekter af metodologien, herunder prøvefremstilling, elektroforesebetingelser, parametre for visuel analyse (f.eks. farvningsintensitet, mikroskoppærens lysstyrke og brug af mikroskopfiltre og kameradynamik) og de omgivende forhold (f.eks. baggrundsbelysning), og fundet, at disse kan påvirke DNA-vandringen (43) (44) (45) (46).

KONTROL AF LABORATORIETS KOMPETENCE

Hvert laboratorium bør dokumentere sin eksperimentelle kompetence vedrørende kometassayet ved at demonstrere sin evne til at opnå enkeltcelle- eller enkeltkernesuspensioner af tilstrækkelig høj kvalitet for alle typer målvæv fra de anvendte arter. Kvaliteten af præparaterne vil først blive evalueret med den procentvise DNA-intensitet i komethalen for bærestofbehandlede dyr, der falder inden for et reproducerbart lavt interval. De aktuelle data tyder på, at gruppens gennemsnitlige procentvise DNA-intensitet i komethalen (baseret på middelværdien af medianerne — se punkt 57 for at få yderligere oplysninger om disse betegnelser) i rotteleveren helst ikke må overstige 6 %, hvilket vil være i overensstemmelse med værdierne i JaCVAM-valideringsforsøget (12) og i andre offentliggjorte og proprietære data. Der findes i øjeblikket ikke tilstrækkelige data til at fremsætte anbefalinger om optimale eller acceptable intervaller for andre vævstyper. Dette udelukker ikke anvendelsen af andre vævstyper, hvis dette er velbegrundet. Testrapporten bør indeholde en relevant gennemgang af resultaterne for kometassayet i disse vævstyper i forhold til den offentliggjorte litteratur eller proprietære data. For det første et ønskeligt med et lavt interval for den procentvise DNA-intensitet i komethalen for at sikre et tilstrækkeligt dynamisk interval til at kunne påvise en positiv effekt. For det andet bør hvert laboratorium være i stand til at reproducere den forventede respons for direkte mutagener og pro-mutagener med forskellig virkemåde som angivet i tabel 1 (punkt 29).

Positive stoffer kan vælges, f.eks. fra JaCVAM-valideringsforsøget (12) eller andre offentliggjorte data (se punkt 9), hvis det er relevant, idet disse begrundes, og idet man påviser tydelige positive responser i vævet af interesse. Evnen til at detektere svage virkninger af kendte mutagener, f.eks. EMS, ved lave doser bør også påvises, f.eks. ved at fastlægge forhold mellem dosis og respons med et passende antal doser og en passende afstand mellem disse. De første bestræbelser bør være fokuseret på at opbygge færdigheder med de hyppigst anvendte væv, f.eks. gnavelever, hvor det er muligt at foretage sammenligninger med eksisterende data og forventede resultater (12). Data for andre vævstyper f.eks. mave/duodenum/jejunum, blod osv. kan indsamles samtidig. Laboratoriet bør kunne dokumentere færdigheder med hver enkelt vævstype fra hver af de arter, man planlægger at undersøge, og bør kunne påvise, at det er muligt at opnå en acceptabel positiv respons med en kendt mutagen (f.eks. EMS) i det pågældende væv.

Der bør indsamles data fra bærestofkontroller/negative kontroller for at påvise, at den negative datarespons kan reproducere, og for at sikre, at de tekniske aspekter af assayet er behørigt kontrolleret, eller for at indikere behovet for at genskabe historiske kontrolintervaller (se punkt 22).

Det skal bemærkes, at selv om flere typer væv kan indsamles ved obduktion og forarbejdes til kometanalyse, skal laboratoriet have ekspertise i at høste flere vævstyper fra samme dyr, hvorved man kan sikre, at enhver potentiel DNA-læsion ikke går tabt, og at kometanalysen ikke forstyrres. Tidsrummet fra aflivning til fjernelse af væv til forarbejdning kan være kritisk (se punkt 44).

Der skal tages hensyn til dyrevelfærden, mens man udvikler færdighederne i denne test, og derfor kan væv fra dyr, der er anvendt i andre test, bruges til at udvikle kompetence i de forskellige aspekter af testen. Desuden er det muligvis ikke nødvendigt at gennemføre en fuldstændig undersøgelse i de faser, hvor en ny forsøgsmetode skal etableres i et laboratorium, og der kan anvendes færre dyr eller testkoncentrationer ved udvikling af de nødvendige færdigheder.

Historiske kontroldata

I løbet af undersøgelserne af kompetencerne bør laboratoriet opbygge en historisk database for at fastlægge positive og negative kontrolintervaller og fordelinger for relevante typer væv og arter. Anbefalinger til, hvordan man opbygger og anvender de historiske data (dvs. kriterier for optagelse og udelukkelse af historiske data og acceptkriterier for et givet forsøg), kan findes i litteraturen (47). Forskellige typer væv og forskellige arter samt forskellige bærestoffer og indgivelsesveje kan give forskellige værdier for den procentvise DNA-intensitet i halen ved negativ kontrol. Derfor er det vigtigt at fastlægge negative kontrolintervaller for hvert enkelt vævstype og art. Laboratorierne bør anvende kvalitetskontrolmetoder som f.eks. kontrolkort (f.eks. C-diagrammer eller X-søjlediagrammer (48)) til at identificere, hvor variable deres kontroldata er, og for at vise, at metodologien er "under kontrol" i deres laboratorium. Det kan også være nødvendigt at udvælge egnede positive kontrolstoffer, dosisintervaller og forsøgsbetingelser (f.eks. elektroforesebetingelser) for at optimere påvisningen af svage virkninger (jf. punkt 17).

Der bør tages hensyn til eventuelle ændringer af forsøgsprotokollen med hensyn til, om de stemmer overens med laboratoriets eksisterende historiske kontroldata. Ved større uoverensstemmelser bør der etableres en ny historisk kontroldatabase.

BESKRIVELSE AF METODEN

Forberedelser

Valg af dyreart

Der anvendes normalt almindelige laboratoriestammer af sunde, unge voksne gnavere (6-10 uger ved behandlingsstart, selv om lidt ældre dyr også er acceptable). Valget af gnaverart bør baseres på i) arter, der anvendes i andre toksicitetsundersøgelser (så man kan korrelere data og opnå mulighed for integrerede undersøgelser), ii) arter, der har udviklet tumorer i et karcinogenicitetsforsøg (ved undersøgelse af mekanismen for carcinogenese), eller iii) arter med den mest relevante metabolisme for mennesker, hvis denne er kendt. Der benyttes rutinemæssigt rotter i denne test. Andre arter kan imidlertid også bruges, hvis dette er etisk og videnskabeligt begrundet.

Miljø og fodringsbetingelser

Før gnavere bør temperaturen i forsøgslokalet ideelt være 22 °C ($\pm$ 3 °C). Den relative luftfugtighed skal ideelt set være 50-60 %, men mindst 30 % og helst ikke over 70 %, bortset fra under rengøring af rummet. Belysningen bør være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med ubegrænset adgang til drikkevand. Valget af føde kan påvirkes af behovet for at sikre en passende iblanding af et testkemikalie, når dette indgives ad denne vej. Gnavere bør anbringes i små grupper (normalt højst fem) af samme køn, hvis der ikke forventes aggressiv adfærd. Dyr bør kun opbevares individuelt, hvis dette er sagligt begrundet. Faste gulve bør så vidt muligt anvendes, eftersom trådnets kan forårsage alvorlige skader (49). Der skal sørges for hensigtsmæssig miljøberigelse.

Klargøring af dyrene

Dyrene randomiseres til henholdsvis kontrol- og behandlingsgrupper. Dyrene identificeres entydigt og vænnes til laboratorieforholdene i mindst fem dage inden behandlingsstart. Den mindst invasive metode til entydig identifikation af dyrene skal anvendes. Egnede metoder omfatter ringmærkning, tagging, mikrochip og biometrisk identifikation. Tå- og øreklipping er ikke videnskabeligt begrundet i disse test. Burene indrettes på en sådan måde, at de mulige følger af burets placering minimeres. Ved undersøgelsens begyndelse bør vægtvariationen mellem dyrene være mindst mulig og ikke over $\pm 20\%$.

Fremstilling af doser

Faste testkemikalier opløses eller suspenderes i passende bærestoffer eller iblandes foder eller drikkevand før indgivelse i dyrene. Flydende testkemikalier kan indgives direkte eller opløses før indgivelse. Til inhalationseksponering kan testkemikalier indgives som gas, damp eller en fast/flydende aerosol, afhængigt af deres fysisk-kemiske egenskaber (50) (51).

Der bør anvendes friske præparater af testkemikaliet, medmindre stabilitetsdata påviser, at opbevaring er acceptabelt, og hensigtsmæssige opbevaringsbetingelser bør defineres.

Testbetingelser

Bærestof

Bærestoffet må ikke frembringe toksiske virkninger ved de anvendte dosismængder og må ikke mistænkes for at indgå i kemisk reaktion med testkemikaliet. Hvis der anvendes andre bærestoffer end velkendte bærestoffer, bør deres anvendelse understøttes af referencedata om deres kompatibilitet for så vidt angår forsøgsdyrene, indgivelsesvej og endepunkt. Det anbefales så vidt muligt først at overveje at anvende vandige opløsningsmidler/bærestoffer. Det skal bemærkes, at nogle bærestoffer (især tyktflydende bærestoffer) kan fremkalde betændelse og øge baggrundsværdierne af DNA-strengbrud på kontaktstedet, især med flere indgifter.

Kontroller

Positive kontroller

På dette tidspunkt bør en gruppe på mindst tre analyserbare dyr af samme køn eller af begge køn, hvis begge køn anvendes (se punkt 32), som er behandlet med et positivt kontrolstof, normalt medtages i alle test. I fremtiden vil det måske være muligt at påvise tilstrækkelig kompetence, således at man kan mindske behovet for positive kontroller. Hvis der anvendes flere prøveudtagningstidspunkter (f.eks. med en enkelt indgivelsesprotokol), er det kun nødvendigt at medtage positive kontroller på et af prøveudtagningstidspunkterne, men det bør sikres, at udformningen er afbalanceret (se punkt 48). Det er ikke nødvendigt at indgive sideløbende positive kontrolstoffer ad samme vej som testkemikaliet, selv om det er vigtigt at benytte samme vej ved måling af virkninger på kontaktstedet. Det bør påvises, at de positive kontrolstoffer medfører brud på DNA-strengen i alle typer væv af interesse for testkemikaliet, og EMS vil sandsynligvis være det oplagte positive kontrolstof, eftersom det har forårsaget brud på DNA-strengen i alle vævstyper, som er blevet undersøgt. Doserne af de positive kontrolstoffer bør vælges, så de frembringer moderate virkninger med henblik på en kritisk vurdering af assayets ydeevne og følsomhed, og kan baseres på dosis/respons-kurver, som laboratoriet har udarbejdet under demonstrationen af kompetence. Den procentvise DNA-intensitet i komethalen hos sideløbende positive kontroldyr bør være i overensstemmelse med laboratoriets forudfastlagte interval for de enkelte vævstyper og prøveudtagningstidspunkter for den pågældende art (se punkt 16). Eksempler på positive kontrolstoffer og nogle af deres målvæv (hos gnavere) findes i tabel 1. Andre stoffer end dem, der er angivet i tabel 1, kan vælges, hvis det er videnskabeligt begrundet.

Tabel 1

Eksempler på positive kontrolstoffer og deres målvæv

Stoffer og CASRN
Ethylmethansulfonat (CASRN 62-50-0) for alle vævstyper
Ethylnitrosourinstof (CASRN 759-73-9) for lever og mavesæk, duodenum eller jejunum
Methylmethansulfonat (CASRN 66-27-3) for lever, mavesæk, duodenum eller jejunum, celler fra udskylningsvæsker fra lunger eller bronchoalveolærer, nyre, blære, lunger, testis og knoglemarv/blod
N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (CASRN 70-25-7) for mavesæk, duodenum eller jejunum
1,2-dimethylhydrazin 2HCl CASRN 306-37-6) for lever og tarm
N-methyl-N-nitrosourinstof (CASRN 684-93-5) for lever, knoglemarv, blod, nyre, mave, jejunum og hjerne.

Negative kontroller

En gruppe af negative kontroldyr, som kun er behandlet med bærestof, og som ellers er behandlet på samme måde som behandlingsgrupperne, bør indgå i alle test for alle prøveudtagningstidspunkter og alle vævstyper. Den procentvise DNA-intensitet i komethalen hos negative kontroldyr bør ligge inden for den foruddefinerede baggrundskoncentration for laboratoriet for hver enkelt vævstype og prøveudtagningstidspunkt for den pågældende art (se punkt 16). Hvis der ikke foreligger historiske eller offentliggjorte kontroldata, som viser, at det valgte bærestof, antallet af indgifter eller indgivelsesvejen ikke medfører skadelige eller genotoksiske virkninger, bør der gennemføres indledende undersøgelser, inden den fulde undersøgelse gennemføres med henblik på at fastslå, at bærestofkontrollen er acceptabel.

FREMGANGSMÅDE

Dyrenes antal og køn

Selv om der findes kun få data for hundyr, som gør det muligt at foretage sammenligninger mellem kønnene med hensyn til kometassayet, er andre in vivo-genotoksiske responser sammenlignelige for han- og hundyr, og derfor kan de fleste undersøgelser udføres på begge køn. Data, der påviser relevante forskelle mellem han- og hundyr (f. eks. forskelle i systemisk toksicitet, metabolisme, biotilgængelighed osv., herunder i en forprøve til bestemmelse af dosisinterval), vil tilskynde til, at begge køn anvendes. I så fald kan det være hensigtsmæssigt at foretage en undersøgelse hos begge køn, f.eks. som led i en toksicitetsundersøgelse med gentagen dosering. Det kan være hensigtsmæssigt at benytte faktormodellen, hvis begge køn anvendes. Oplysninger om, hvordan dataene analyseres med denne model, findes i tillæg 2.

Gruppernes størrelse ved undersøgelsens start (og under fastlæggelsen af kompetence) bør fastlægges for at få mindst fem analyserbare dyr af samme køn eller af hvert køn, hvis begge anvendes, pr. gruppe (færre i den sideløbende kontrolgruppe, jf. punkt 29). Hvis eksponeringen af mennesker for det kemiske stof er kønsspecifik, som det f.eks. er tilfældet med visse farmaceutiske stoffer, bør testen udføres med det pågældende køn. Vejledende vil en undersøgelse, der udføres i henhold til de i punkt 33 fastlagte parametre med tre dosisgrupper og en sideløbende negativ og positiv kontrolgruppe (hvor hver gruppe består af fem dyr af samme køn), typisk højst kræve 33-25 dyr.

BEHANDLINGSPLAN

Dyrene bør gives daglige behandlinger over en periode på to dage eller derover (dvs. to eller flere behandlinger med ca. 24 timers mellemrum), og prøverne bør indsamles en gang 2-6 timer (eller ved $T_{\max}$) efter sidste behandling (12). Prøver fra længerevarende indgivelsesplaner (f.eks. 28 dages daglig dosering) er acceptable. Der findes dokumentation for en vellykket kombination af komet- og erythrocyt-mikrokernetesten (10) (19). Dog bør man nøje overveje logistikken i forbindelse med vævsprøver til kometanalyse sammen med kravene til vævsprøver til andre typer af toksikologiske vurderinger. I det fleste tilfælde er det ikke hensigtsmæssigt at høste 24 timer efter den sidste dosis, hvilket er typisk for en generel undersøgelse af toksicitet (se afsnit 40 om prøveudtagnings-tidspunkt). Brug af andre behandlings- og prøveudtagningsplaner bør begrundes (se tillæg 3). Eksempelvis kan en enkelt behandling med flere prøver anvendes, men det skal imidlertid bemærkes, at det er nødvendigt med flere dyr til en undersøgelse med en enkelt indgift på grund af behovet for flere prøveudtagningstidspunkter, men i visse tilfælde kan det være at foretrække, f.eks. når testkemikallet inducerer overdreven toksicitet efter gentagen indgivelse.

Uanset hvordan testen udføres, er det acceptabelt, så længe testkemikallet giver en positiv respons, eller, for en negativ undersøgelse, så længe eksponering af eller toksicitet over for målvævet påvises direkte eller indirekte, eller hvis grænsedosis opnås (se punkt 36).

Testkemikalier kan også indgives som to deldoser, dvs. to behandlinger samme dag med kun 2-3 timers interval, hvorved det bliver lettere at indgive et større volumen. Under disse omstændigheder bør prøveudtagnings-tidspunktet planlægges på grundlag af tidspunktet for den sidste dosering (se punkt 40).

Dosisstørrelse

Hvis der gennemføres en indledende forprøve til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger egnede data fra andre relevante undersøgelser, der kan bruges til at vælge dosis, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme, køn og behandlingsmåde, som agtes benyttet i hovedundersøgelsen i henhold til de gældende fremgangsmåder for gennemførelse af undersøgelser af dosisinterval. Formålet med undersøgelsen bør være at identificere den højeste tolererede dosis (MTD) defineret som den dosis, der medfører lette toksiske virkninger i forhold til undersøgelsesperiodens varighed (f.eks. tydelige kliniske signaler såsom unormal adfærd eller unormale reaktioner, fald i kropsvægt eller cytotoxicitet i målvævet), men ikke død eller tegn på smerte eller lidelse, der kræver human aflivning. For et ikke-giftigt testkemikalie med en indgivelsesperiode på 14 dage eller mere er den maksimale (grænse-) dosis 1 000 mg/kg legemsvægt/dag. For indgivelsesperioder på mindre end 14 dage er den maksimale (grænse-) dosis 2 000 mg/kg kropsvægt/dag. For visse typer testkemikalier (f.eks. humanlægemidler), som er omfattet af særlige krav, kan disse bestemmelser variere.

Kemikalier, der udviser mætning af toksikokinetiske egenskaber eller fremkalder afgiftningsprocesser, der kan føre til et fald i eksponeringen efter en lang indgivelsesperiode, kan være undtaget fra kriterierne om dosisfastsættelse og bør vurderes fra gang til gang.

For både akutte og subakutte versioner af kometassayet bør man ud over den maksimale dosis (MTD, størst mulige dosis, maksimal eksponering eller grænsedosis) vælge en aftagende rækkefølge af mindst to yderligere dosisniveauer med en hensigtsmæssig spredning (helst adskilt af mindre end 10) for hvert prøveudtagningstidspunkt med henblik på at påvise dosisrelaterede responser. De anvendte dosisniveauer bør imidlertid også helst dække et interval fra det maksimale til et niveau, der medfører lav eller ingen toksicitet. Når der observeres toksicitet i målvævet (knoglemarven) ved alle de testede dosisniveauer, tilrådes det at foretage yderligere undersøgelser ved ikke-toksiske doser (jf. punkt 54-55). Undersøgelser, hvor man ønsker at foretage en grundigere undersøgelse af dosis/responskurven, kan kræve en eller flere yderligere dosisgrupper.

Indgivelse af doser

Den forventede indgivelsesmåde for mennesker bør overvejes i forbindelse med udformningen af et assay. Andre indgivelsesmåder såsom føde, drikkevand, topisk, subkutant, intravenøst, oralt (med sonde), inhalation, intratrachealt eller implantation kan vælges, hvis de kan begrundes. Under alle omstændigheder bør der vælges en indgivelsesmåde, der sikrer tilstrækkelig eksponering af målvævet. Intraperitoneal injektion anbefales normalt ikke, da det typisk ikke er en relevant eksponeringsvej for mennesker, og den bør kun anvendes med særlig begrundelse (f.eks. visse positive kontrolstoffer, til undersøgelsesformål eller til visse lægemidler, der administreres ad intraperitoneal vej). Hvor stor en væskemængde der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Denne mængde må højst være 1 ml/100 g kropsvægt, bortset fra vandige opløsninger, af hvilke der kan anvendes 2 ml/100 g kropsvægt. Brug af større mængder end dette (hvis dette er tilladt ifølge lovgivningen om dyrevelfærd) bør begrundes. Så vidt muligt bør de forskellige dosisniveauer opnås ved at justere koncentrationen af doseringsformuleringen for at sikre et konstant volumen i forhold til kropsvægt ved alle dosisniveauer.

Prøveudtagningstidspunkt

Prøveudtagningstidspunktet er en kritisk variabel, fordi det bestemmes af den periode, der er nødvendig for, at testkemikalierne kan opnå maksimal koncentration i målvævet og for at frembringe DNA-strengbrud, men inden disse brud fjernes, udbedres eller fører til celledød. Persistensen af nogle af de læsioner, som fører til DNA-strengbrud, som registreres af kometassayet, kan være meget kort, i det mindste for visse kemikalier, som testes in vitro (52) (53). Hvis der er mistanke om sådanne forbigående DNA-skader, bør der træffes foranstaltninger med henblik på at begrænse tabene ved at sikre, at væv udtages tilstrækkeligt tidligt, evt. tidligere end de nedenfor angivne standardtidspunkter. De(t) optimale prøveudtagningstidspunkt(er) kan være kemikalie- eller rutespecifikt, f. eks. hurtig vævseksponering med intravenøs indgivelse eller eksponering ved indånding. Dette betyder, at når det er muligt, bør prøveudtagningstidspunkterne fastlægges ud fra kinetiske data (f.eks. (T_{max}), hvor den maksimale plasma- eller vævskoncentration (C_{max}) opnås, eller ved den stabile tilstand ved flere indgifter). I mangel af kinetiske data vil det være et egnet kompromis til måling af genotoksicitet at udtage prøver 2-6 timer efter den sidste behandling ved to eller flere behandlinger eller både 2-6 og 16-26 timer efter en enkelt indgift, selv om det er vigtigt at obducere alle dyr på samme tidspunkt efter den sidste (eller eneste) dosis. Oplysninger om forekomsten af toksiske virkninger i målorganer (hvis disse findes) kan også bruges til at vælge hensigtsmæssige prøveudtagningstidspunkter.

Observationer

Der bør foretages generelle kliniske observationer vedrørende dyrenes helbred, og de bør registreres mindst en gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er) hver dag og under hensyntagen til det tidspunkt, hvor de forventede virkninger efter dosering topes (54). Alle dyr observeres mindst to gange dagligt for morbiditet og dødelighed. Ved undersøgelser af længere varighed bør alle dyr vejes mindst en gang om ugen og ved afslutningen af testperioden. Fødeindtaget måles ved hver kostændring og mindst en gang ugentligt. Hvis testkemikallet indgives via drikkevandet, måles vandindtaget ved hvert vandskift og mindst en gang ugentligt. Dyr, der udviser ikkedødelig indikation for høj toksicitet, bør aflives før testperiodens udløb og anvendes generelt ikke til kometanalyse.

Opsamling af væv

Eftersom det er muligt at undersøge induktion af DNA-strengbrud (kometer) i næsten alle væv, bør begrundelsen for valg af det indsamlede væv være klart defineret og baseret på begrundelsen for, at man foretager undersøgelsen i kombination med evt. eksisterende ADME-, genotoksicitets-, karcinogenicitet- eller andre toksicitetsdata for det undersøgte testkemikalie. Vigtige faktorer, der bør indgå i overvejelserne, er indgivelsesmåde (baseret på sandsynlige humane eksponeringsveje), den forventede vævsdistribution og -absorption, metabolismens rolle og testkemikalernes mulige handlingsmekanisme. Leveren er det væv, der undersøges oftest, og for hvilken der findes flest

data. I mangel af baggrundsinformation, og hvis der ikke identificeres nogen specifikke vævstyper af interesse, kan det begrundes at foretage udtagning af leverprøver, eftersom den er en primær lokalitet for xenobiotisk metabolisme og ofte er stærkt udsat for såvel moderstof(fer) som metabolit(ter). I nogle tilfælde kan undersøgelse af det direkte kontaktsted (f.eks. ved oralt indgivne kemikalier proventriculus eller duodenum/jejunum, eller ved indånding af kemikalier lungerne) være særdeles relevant. De supplerende eller alternative vævstyper bør udvælges på grundlag af de konkrete årsager til, at testen gennemføres, men det kan være nyttigt at undersøge flere vævstyper fra de samme dyr, hvis laboratoriet har dokumenteret kompetence med disse vævstyper og med at håndtere flere vævstyper på samme tid.

Fremstilling af prøver

For de processer, der er beskrevet i de følgende afsnit (nr. 44-49), er det vigtigt, at alle opløsninger eller stabile suspensioner anvendes inden udløbsdatoen, eller at de fremstilles lige inden testen, når dette er nødvendigt. Også i de følgende afsnit betragtes den tid, der bruges på at i) fjerne hver vævstype efter obduktion, ii) behandle hver vævstype med henblik på celle-/kernesuspensioner og iii) behandle suspensionen og præparere objektglassene, som kritiske variabler (se definitioner, tillæg 1), og den acceptable varighed af hver af disse faser bør fastlægges under definition af metoden og påvisning af kompetencer.

Dyrene aflives i overensstemmelse med gældende lovgivning om dyrevelfærd og 3R-princippet på de(t) relevante tidspunkt(er) efter sidste behandling med et testkemikalie. De(t) udvalgte væv fjernes og dissekeres, og en del indsamles til kometassayet, samtidig med at en del af vævet opskæres og anbringes i formaldehydopløsning eller et passende fiksativ til mulig histopatologisk analyse (se punkt 55) i henhold til standardmetoderne (12). Vævet til kometassayet anbringes i hakningsbufferen, skylles tilstrækkeligt med koldt hakningsbuffer for at fjerne resterende blod og opbevares i en iskold hakningsbuffer, indtil det skal bruges. In situ-perfusion kan også udføres, f.eks. for lever og nyre.

Der findes mange offentliggjorte metoder til celle-/kerneisolation. Disse omfatter hakning af væv som f.eks. lever og nyre, skrabning af slimhindeoverflader for mave-tarmkanalen, homogenisering og enzymisk fordøjelse. Ved JaCVAM-valideringstesten undersøgte man kun isolerede celler, og med henblik på etablering af metoden og for at være i stand til at henvise til JaCVAM-forsøgsdataene med hensyn til dokumentation af kompetence foretrakkes isolerede celler. Det er dog blevet påvist, at der ikke var nogen væsentlig forskel i assayresultaterne, uanset om man anvendte isolerede celler eller kerner (8). Forskellige metoder til isolering af celler/kerner (f.eks. homogenisering, hakning, enzymisk fordøjelse og filtrering) gav ligeledes sammenlignelige resultater (55). Derfor kan enten isolerede celler eller isolerede kerner anvendes. Et laboratorium bør foretage en grundig vurdering og validering af vævsspecifikke metoder til isolation af enkeltceller/-kerner. Som diskuteret i punkt 40 kan persistensen af nogle af de læsioner, som betyder, at DNA-strengbrud kan registreres med kometassayet, være meget kort (52) (53). Derfor er det, uanset hvilken metode der anvendes til at fremstille suspensioner med en celle/kerne, vigtigt, at vævene behandles så hurtigt som muligt, efter at dyrene er aflivet, og opbevares under forhold, der reducerer fjernelse af læsioner (f.eks. ved at opbevare vævet ved lav temperatur). Cellesuspensioner bør opbevares iskoldt, indtil de er klar til brug, så man kan påvise minimal variation mellem prøverne samt relevante positive og negative kontrolresponses.

PRÆPARERING AF OBJEKTGLAS

Præparering af objektglas bør ske så hurtigt som muligt (helst inden for en time) efter præparering af enkeltcellen/-kernen, men temperaturen og tidsrummet mellem dyrets død og præparering af objektglasset skal kontrolleres nøje og valideres i henhold til laboratoriets bestemmelser. Mængden af cellesuspension, der tilsættes agarose med lavt smeltepunkt (normalt 0,5-1,0 %) for at præparere objektglassene, må ikke sænke den procentvise andel af agarose med lavt smeltepunkt til under 0,45 %. Den optimale celletæthed bestemmes ved hjælp af billedanalyse-systemet, der anvendes til scoring af kometer.

Lysis

Lysisbetingelserne er også en kritisk variabel og kan påvirke de strengbrud, der skyldes særlige typer DNA-ændringer (visse DNA-alkyleringer og baseaddukter). Det anbefales derfor, at lysisbetingelser holdes så konstante som muligt for alle objektglas i et eksperiment. Når objektglassene er præpareret, nedsænkes de i den afkølede lysisopløsning i mindst en time (eller natten over) ved omkring 2-8 °C i dæmpet belysning, f.eks. gult lys (eller lystæt), så de ikke udsættes for hvidt lys, der kan indeholde UV-komponenter. Efter denne inkubationsperiode skylles objektglassene for at fjerne tilbageværende rengøringsmiddel og salte inden baseudfoldningstrinnet. Dette kan gøres med rensed vand, neutraliseringsbuffer eller fosfatbuffer. Elektroforesebuffer kan også anvendes. Dette vil opretholde det basiske miljø i elektroforesekompartimentet.

Udfoldning og elektroforese

Objektglassene placeres tilfældigt på platformen i en ubåds-lignende elektroforeseenhed, der indeholder tilstrækkeligt meget elektroforeseopløsning til, at objektglassenes overflade er fuldstændig dækket (dækningens dybde skal også være den samme fra kørsel til kørsel). I en anden type elektroforeseenheder til kometassays, dvs. enheder med aktiv køling, cirkulation og strømforsyning med høj kapacitet, vil en større dækning med opløsningen føre til en større strømstyrke ved konstant spænding. Objektglassene bør anbringes på en afbalanceret måde i elektroforesebeholderen for at afbøde virkningerne af eventuelle hældninger eller kanter i beholderen og for at minimere variationen fra batch til batch, dvs. at der ved hver elektroforesekørsel bør være det samme antal objektglas fra hvert enkelt dyr i undersøgelsen og prøver fra de forskellige doseringsgrupper samt negative og positive kontroller. Objektglassene skal stå i mindst 20 minutter, så DNA'et kan foldes ud, og udsættes derefter for elektroforese under kontrollerede forhold, som vil øge assayets følsomhed og dynamiske område (dvs. føre til acceptable niveauer for den procentvise DNA-intensitet i komethalen for negative og positive kontroller, hvilket maksimerer følsomheden). Graden af DNA-migration er lineært forbundet med varigheden af elektroforesen og ligeledes med styrken (V/cm). Baseret på JaCVAM-forsøget kan dette være 0,7 V/cm i mindst 20 minutter. Varigheden af elektroforesen anses for at være en kritisk variabel, og elektroforesetiden bør fastsættes med henblik på at optimere det dynamiske område. Længere elektroforesetider (f.eks. 30 eller 40 minutter for at maksimere følsomheden) fører til stærkere positive responser med kendte mutagener. Men længere elektroforesetider kan dog også føre til uforholdsmæssig stor vandring i kontrolprøverne. Ved hvert forsøg bør spændingen holdes konstant, og variationen af de øvrige parametre bør ligge inden for et snævert og specificeret område, f.eks. ved JaCVAM-forsøget, hvor der ved 0,7 V/cm frembringes en startstrømstyrke på 300 mA. Bufferdybden bør tilpasses med henblik på at opnå de nødvendige betingelser og bør opretholdes gennem hele forsøget. Strømstyrken ved elektroforeseperiodens start og slutning registreres. De optimale betingelser bør derfor fastsættes ved den første demonstration af kompetence i det pågældende laboratorium med hver af de undersøgte vævstyper. Temperaturen i elektroforeseopløsningen i løbet af udfoldning og elektroforese bør holdes på et lavt niveau, normalt 2-10 °C (10). Temperaturen i elektroforeseopløsningen registreres, når udfoldningen begynder, ved starten og ved slutningen af elektroforesen.

Efter endt elektroforese nedsænkes/skylles objektglassene i/med neutraliseringsbufferen i mindst 5 minutter. Geler kan farves og scores "friske" (f.eks. inden for 1-2 dage) eller kan dehydreres med henblik på senere scoring (f.eks. inden for 1-2 uger efter farvning) (56). Betingelserne bør imidlertid valideres under demonstrationen af kompetencer, og historiske oplysninger bør fremskaffes og opbevares separat for hver af disse betingelser. I sidstnævnte tilfælde bør objektglassene dehydreres ved nedsækning i absolut ethanol i mindst 5 minutter, lufttørres og herefter opbevares enten ved stuetemperatur eller i en beholder i køleskab indtil scoringen.

Målemetoder

Kometer bør scores kvantitativt ved hjælp af et automatisk eller halvautomatisk billedanalysesystem. Objektglassene farves med en passende fluorescerende farve, f.eks. SYBR Gold, Green I, propidiumiodid eller ethidiumbromid, og måles ved en passende forstørrelse (f.eks. 200x) med et mikroskop, der er udstyret med epi-fluorescens og hensigtsmæssige detektorer eller et digitalkamera (f.eks. CCD).

Celler kan inddeles i tre kategorier, som beskrevet i atlasset over kometbilleder (57), nemlig egnede til bedømmelse, ikke egnede til bedømmelse og "pindsvin" (se afsnit 56 for en yderligere diskussion). Kun celler, der er egnede til bedømmelse (klart defineret hoved og hale uden interferens med tilstødende celler), bør scores for den procentvise DNA-intensitet i komethalen for at undgå artefakter. Det er ikke nødvendigt at rapportere hyppigheden af celler, der ikke er egnede til scoring. Hyppigheden af pindsvin bestemmes på grundlag af den visuelle scoring (eftersom mangel på et klart defineret hoved betyder, at de ikke umiddelbart kan ses ved billedanalyse) i mindst 150 celler pr. prøve (se punkt 56 for yderligere diskussion) og dokumenteres særskilt.

Alle objektglas til analyser, herunder fra positive og negative kontroller, bør kodes selvstændigt og scores "blindt", så bedømmeren ikke er bekendt med eksponeringsbetingelserne. For hver prøve (pr. vævstype pr. dyr) bør mindst 150 celler (ekskl. pindsvin — se punkt 56) analyseres. Scoring af 150 celler pr. dyr for mindst fem dyr pr. dosis (mindre ved den sideløbende positive kontrol — se punkt 29) sikrer tilstrækkelig statistisk power i henhold til analysen i Smith et al., 2008 (5). Hvis der anvendes objektglas, kan dette ske fra to eller tre scorede objektglas pr. prøve, når der anvendes fem dyr pr. gruppe. Flere områder af objektglasset bør observeres ved en tæthed, der sikrer, at der ikke forekommer overlappning af halerne. Det bør undgås at foretage scoring ved kanten af objektglassene.

DNA-strengbrud i kometassayet kan måles ved hjælp af uafhængige endepunkter såsom den procentvise DNA-intensitet i komethalen, halelængde og halemoment. Alle tre målinger kan foretages, hvis man anvender hensigtsmæssige softwaresystemer til billedanalyse. Den procentvise DNA-intensitet i komethalen (også kaldet procentvis haleintensitet) anbefales dog til evaluering og fortolkning af resultater (12) (40) (41) (42) og bestemmes af intensiteten af DNA-fragmenter i halen udtrykt som en procentdel af cellens samlede intensitet (13).

Vævsbeskadigelse og cytotoxicitet

Positive resultater i kometassayet skyldes muligvis ikke udelukkende genotoksicitet, idet toksicitet i målvævet også kan føre til stigninger i DNA-vandringen (12) (41). Omvendt kan der ofte observeres lav eller moderat cytotoxicitet med kendte genotoksiner (12), hvilket viser, at det ikke er muligt at skelne mellem DNA-migration forårsaget af genotoksicitet og cytotoxicitet, der udelukkende forekommer i kometassayet. Når der imidlertid observeres stigninger i DNA-migrationen, anbefales det, at en eller flere indikatorer for cytotoxicitet undersøges, eftersom dette kan bidrage til fortolkningen af resultaterne. Stigninger i DNA-migration samtidig med tilstedeværelsen af klare beviser for cytotoxicitet bør fortolkes med forsigtighed.

Der har været foreslået mange målinger af cytotoxicitet, og histopatologiske forandringer anses for en relevant måling af vævstoksicitet. Observationer såsom inflammation, celleinfiltration og apoptotiske eller nekrotiske forandringer er blevet associeret med øget DNA-migration, men som påvist i JaCVAM-valideringstesten (12) findes der ikke en endelig liste over histopatologiske forandringer, som altid er forbundet med øget DNA-migration. Ændrede foranstaltninger inden for klinisk kemi (f.eks. AST, ALT) kan også give nyttige oplysninger om vævsskader, og man kan også overveje supplerende indikatorer såsom caspaseaktivering, TUNNEL-farvning, Annexin V-farvning osv. Der findes dog kun begrænsede offentliggjorte data, som har været anvendt til in vivo-undersøgelser, og nogle kan være mindre pålidelige end andre.

Pindsvin (eller skyer, spøgelsesceller) er celler, der udviser et mikroskopbillede, der består af et lille eller ikke-eksisterende hoved og store, diffuse haler, og anses for at være stærkt beskadigede celler, selv om pindsvinenes ætiologi er usikker (se tillæg 3). På grund af deres udseende er målinger af den procentvise DNA-intensitet i komethalen ved billedanalyse upålidelige, og derfor bør pindsvin vurderes separat. Forekomsten af pindsvin noteres og rapporteres, og enhver relevant stigning, der menes at skyldes testkemikaliet, bør undersøges og fortolkes med forsigtighed. Kendskab til testkemikalernes potentielle virkemåde kan hjælpe med ved sådanne overvejelser.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

Dyret er forsøgsenheden, og derfor bør både data for de enkelte dyr og de opsummerede resultater præsenteres i tabelform. På grund af den hierarkiske datastruktur anbefales det at bestemme middelværdien af den procentvise DNA-intensitet i komethalen for hvert objektglas og beregne gennemsnittet af middelværdierne for hvert dyr (12). Gennemsnittet af middelværdierne for de enkelte dyr bestemmes derefter for at opnå et gennemsnit for gruppen. Alle disse værdier bør medtages i rapporten. Alternative metoder (jf. punkt 53) kan anvendes, hvis dette er videnskabeligt og statistisk begrundet. Der kan foretages en statistisk analyse ved hjælp af forskellige metoder (58) (59) (60) (61). Ved valget af de statistiske metoder bør der tages hensyn til behovet for at transformere dataene (f. eks. logaritme eller kvadratrodd) og/eller for at tilføje et mindre tal (f.eks. 0,001) til alle (selv ikke-nul-) værdier for at mindske effekten af nul-celle-værdier, jf. diskussionen i ovennævnte referencer. Nærmere oplysninger om analyse af forholdet mellem behandling og køn, når begge køn anvendes, og efterfølgende analyse af data, hvor der enten konstateres eller ikke konstateres forskelle, findes i tillæg 2. Data om toksicitet og kliniske tegn bør også anføres.

Acceptkriterier

Accept af en test er baseret på følgende kriterier:

- a. Den sideløbende negative kontrol anses for at kunne føjes til laboratoriets historiske negative kontrolldatabase som beskrevet i punkt 16.
- b. Sideløbende positive kontroller (jf. punkt 29) bør fremkalde responser, der er forenelige med responserne i den historiske positive kontrolldatabase, og medføre en statistisk set signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol.
- c. Et tilstrækkeligt antal celler og doser er blevet analyseret (punkt 52 og 36-38).
- d. Kriterierne for valg af højeste dosis er i overensstemmelse med kriterierne i punkt 36.

Evaluerings og fortolkning af resultater

Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart positivt, hvis:

- a. mindst en af testdoserne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol
- b. stigningen er dosisafhængig, når den evalueres med en passende trend test
- c. et eller flere af resultaterne ligger uden for fordelingen af de historiske negative kontrolldata for bestemte arter, bærestoffer, indgivelsesveje, væv og antal indgifter.

Når alle disse kriterier er opfyldt, anses testkemikaliets for at kunne fremkalde strengbrud på DNA i de vævstyper, der undersøges i dette testsystem. Hvis kun et eller to af disse kriterier er opfyldt, se afsnit 62.

Såfremt alle acceptkriterier er opfyldt, anses et testkemikalie for at være klart negativt, hvis:

- a. ingen af testkoncentrationerne udviser en statistisk signifikant stigning sammenlignet med den sideløbende negative kontrol
- b. der ikke indtræder en koncentrationsafhængig stigning ved evaluering med en passende trend test
- c. alle resultater ligger inden for fordelingen af de historiske negative kontrolldata for bestemte arter, bærestoffer, ruter, væv og antal indgifter
- d. der er påvist direkte eller indirekte evidens, som støtter eksponering af eller toksicitet over for målvævet.

Testkemikaliets anses i så fald for ikke at kunne fremkalde strengbrud på DNA i de vævstyper, der undersøges i dette testsystem.

Der er ikke krav om verifikation af en klart positiv eller negativ respons.

Hvis responsen hverken er klart negativ eller positiv (dvs. at ikke alle kriterier i punkt 59 eller 60 er opfyldt) og for at bidrage til at fastslå den biologiske relevans af et resultat, bør dataene evalueres af eksperter, og/eller der bør foretages yderligere undersøgelser, hvis det er videnskabeligt begrundet. Det kan være nyttigt at score flere celler eller foretage en ny undersøgelse, evt. med optimerede forsøgsbetingelser (f.eks. dosisintervaller, andre indgivelsesveje, andre prøveudtagningstidspunkter eller andet væv).

I sjældne tilfælde, selv efter yderligere undersøgelser, giver dataene ikke mulighed for at konkludere, om resultaterne er positive eller negative; konklusionen er derfor, at resultaterne er tvetydige.

For at vurdere den biologiske relevans af et positivt eller tvetydigt resultat er der behov for oplysninger om cytotoxicitet i målvævet (jf. punkt 54-55). I tilfælde af at der alene forekommer positive eller usikre resultater, hvis der er klar evidens for cytotoxicitet, vil man konkludere, at undersøgelsen er tvetydig for genotoksicitet, medmindre der foreligger tilstrækkelige oplysninger til at underbygge en endelig konklusion. I tilfælde af et negativt undersøgelsesresultat, hvor der er tegn på toksicitet ved alle testede doser, kan det være tilrådeligt at foretage yderligere undersøgelser ved ikke-toksiske doser.

Testrapport

Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

- kilde, evt. partinummer
- testkemikaliets stabilitet, sidste anvendelsesdato eller dato for ny analyse, hvis denne er kendt.

Stof med kun en bestanddel:

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

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

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

Opløsningsmiddel/bærestof:

- begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof
- testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet/bærestoffet, hvis dette er kendt
- fremstilling af dosisformuleringer
- analytiske bestemmelser af formuleringer (f.eks. stabilitet, homogenitet og nominal koncentration).

Forsøgsdyr:

- anvendte arter/stammer samt videnskabelige og etiske begrundelser for valget
- dyrenes antal, alder og køn

- oprindelse, miljø, føde, berigelse osv.
- de enkelte dyrs vægt ved testens start og afslutning, samt interval for legemsvægt samt middel- og standardafvigelse for legemsvægten for hver enkelt gruppe

Testbetingelser:

- positive og negative (bærestof/opløsningsmiddel) kontroldata
- resultater fra (en eventuel) undersøgelse til bestemmelse af dosisinterval
- begrundelse for valg af dosisniveau
- oplysninger om præparering af testkemikaliet
- oplysninger om indgivelse af testkemikaliet
- begrundelse for indgivelsesvej
- injektionssted (for subkutane og intravenøse undersøgelser)
- metoder til fremstilling af prøver, om muligt histopatologiske analyser, især for et kemikalie med positiv kometrespons
- begrundelse for valg af væv
- metoder til kontrol af, at testkemikaliet er nået frem til det almindelige kredsløb eller målvævet om der er opnået negative resultater
- faktisk dosis (mg/kg kropsvægt/dag) beregnet på baggrund af testkemikaliet's koncentration i føde/drikkevand (ppm) og fødeoptagelse, hvis dette er relevant
- oplysninger om kvalitet af føde og vand
- detaljeret beskrivelse af behandling og prøveudtagningsplaner samt begrundelser for valg (f.eks. eventuelle toksikokinetiske data)
- metode til smertelindring, analgesi
- aflivningsmetode
- procedurer for isolering og opbevaring af væv
- metoder til fremstilling af enkeltcelle-/enkeltkernesuspension
- kilde og partinummer for alle reagenser (når det er muligt)
- metoder til evaluering af cytotoxicitet
- elektroforese
- anvendte farvningsteknikker
- metoder til scoring og måling af kometer.

Resultater:

- eventuelle almindelige kliniske observationer, før og i løbet af testperioden for hvert dyr
- dokumentation for cytotoxicitet, hvis det er relevant
- for undersøgelser af længere end en uges varighed: dyrenes individuelle vægt i løbet af undersøgelsen, herunder interval for kropsvægt, middel- og standardafvigelse for hver gruppe samt fødeindtag

- dosis/respons-forhold, hvor det kan beregnes
- for hver vævstype/hvert dyr, den procentvise DNA-intensitet i komethalen (eller andre målinger, hvis dette vælges) og middelværdier pr. objektglas, gennemsnitsværdier pr. dyr og middelværdier pr. gruppe
- sideløbende og historiske negative kontroldata med intervaller, medianer/gennemsnit og standardafvigelser for hver evalueret vævstype
- data fra sideløbende negative og positive kontrolprøver
- for andet væv end lever, en dosis/respons-kurve, hvortil den positive kontrol anvendes. Dette kan være fra data, der er indsamlet i forbindelse med godtgørelse af kompetence (jf. punkt 16-17) og bør ledsages af en begrundelse med henvisninger til aktuel litteratur for at fastslå hensigtsmæssigheden af størrelsen og spredningen af responserne på kontrollerne i dette væv
- anvendte statistiske analyser og metoder samt kriterier for, hvornår en respons kan anses som positiv, negativ eller tvetydig
- hyppigheden af pindsvin i hver gruppe og pr. dyr.

Diskussion af resultaterne

Konklusion

Referencer

LITTERATUR

- (1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, Vol. 654/2, pp. 114-32.
- (2) Brendler-Schwaab, S. *et al.* (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, pp. 245-54.
- (3) Burlinson, B. *et al.* (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, pp. 31-5.
- (4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 143-63.
- (5) Smith, C.C. *et al.* (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 233-40.
- (6) Hartmann, A. *et al.* (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, pp. 45-51.
- (7) McKelvey-Martin, V.J. *et al.* (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, pp. 47-63.
- (8) Tice, R.R. *et al.* (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 206-21.
- (9) Singh, N.P. *et al.* (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, pp. 184-91.
- (10) Rothfuss, A. *et al.* (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, pp. 40-69.
- (11) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

- (12) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, nr. 195 og 196, OECD Publishing, Paris.
- (13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "Comet" assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, pp. 86-94.
- (14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, pp. 207-14.
- (15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, pp. 249-61.
- (16) Rothfuss, A. *et al.* (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108-20.
- (17) Kushwaha, S. *et al.* (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, pp. 145-54.
- (18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 187-99.
- (19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, pp. 7-19.
- (20) Recio, L. *et al.* (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, pp. 149-62.
- (21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 621-3.
- (22) Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations**, *Mutagenesis*, Vol. 19/1, pp. 51-9.
- (23) Nessler, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, pp. 28-41.
- (24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 393/1-2, pp. 175-8.
- (25) Toyozumi, T. *et al.* (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, pp. 175-80.
- (26) Struwe, M. *et al.* (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, pp. 240-9.
- (27) Wada, K. *et al.* (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, pp. 26-30.
- (28) Wang, A. *et al.* (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, pp. 51-9.

- (29) Burlinson, B. *et al.* (2007), *In Vivo Comet Assay Workgroup*, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 31-5.
- (30) Jackson, P. *et al.* (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, pp. 486-500.
- (31) Sasaki, Y.F. *et al.* (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, pp. 629-799.
- (32) Sekihashi, K. *et al.* (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 53-74.
- (33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity**, *Mutation Research*, Vol. 681/1, pp. 3-12.
- (34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, pp. 275-282.
- (35) Cordelli, E. *et al.* (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, pp. 443-451.
- (36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, pp. 167-72.
- (37) Pfuhler, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 196-201.
- (38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 165-81.
- (39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), **Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay**, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, pp. 267-282.
- (40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605 (1-2), pp. 7-16.
- (41) Burlinson, B. *et al.* (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol.627/1, pp. 31-5.
- (42) Kumaravel, T.S. *et al.* (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, pp. 53-64.
- (43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, pp. 689-95.
- (44) Møller, P. *et al.* (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 109-11.
- (45) Forchhammer, L. *et al.* (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 113-23.
- (46) Azqueta, A. *et al.* (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, pp. 41-45.

- (47) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.
- (48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, John Wiley and Sons, New York 2nd ed.
- (49) Bilag A til den europæiske konvention om beskyttelse af hvirveldyr, der anvendes til forsøg og andre videnskabelige formål (ETS nr. 123)
- (50) Kapitel B.8 til dette bilag: *Subakut toksicitet (inhalation): 28-dages undersøgelse*.
- (51) Kapitel B.29 til dette bilag: *Subkronisk toksicitet (inhalation): 90-dages undersøgelse*.
- (52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, pp. 141-45.
- (53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, pp. 35-41.
- (54) OECD (2002), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.
- (55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, pp. 50-4.
- (56) Hartmann, A. *et al.* (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, pp.45-51.
- (57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.
- (58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, pp. 109-19.
- (59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 167-75.
- (60) Bright, J. *et al.* (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, pp. 485-93.
- (61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 171-82.
-

Tillæg 1

DEFINITIONER

Alkalisk encellet gelelektroforese: Følsom metode til påvisning af primær DNA-skade på celle-/kerneniveau.

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

Komet: Den form, som nukleoider får efter at været udsat for et elektroforetisk felt, på grund af ligheden med kometer: hovedet er kernen, og halen udgøres af DNA'et, der migrerer ud af kernen i det elektriske felt.

En kritisk variabel/parameter: En protokolvariabel, hvor en lille ændring kan få stor indvirkning på assayets konklusion. Kritiske variabler kan være vævsspecifikke. Kritiske variabler bør ikke ændres, især ikke under en test, uden at der er taget hensyn til, hvordan ændringen vil ændre en assayresponsen, f.eks. som angivet af størrelsen og variationen i positive og negative kontroller. Testrapporten bør indeholde en opgørelse over ændringer af kritiske variabler, der er foretaget under testen eller sammenholdt med standardprotokollen for laboratoriet, samt en begrundelse for hver ændring.

Halens intensitet eller den procentvise DNA-intensitet: Dette svarer til komethalens intensitet i forhold til den samlede intensitet (hoved plus hale). Det afspejler mængden af DNA-brud, udtrykt som procentdel.

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

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

Tillæg 2

FAKTORMODEL TIL IDENTIFIKATION AF KØNSBETINGEDE FORSKELLE I IN VIVO-KOMETASSAYET**Faktormodellen og dens analyse**

I denne model testes mindst 5 hanner og 5 hunner på hvert koncentrationsniveau, hvilket betyder, at der med denne model anvendes mindst 40 dyr (20 hanner og 20 hunner, plus relevante positive kontroller).

Modellen, som er en af de enklere faktormodeller, svarer til en tovejsanalyse af varians med køn og koncentration som de primære virkninger. Dataene kan analyseres ved hjælp af mange statistiske standardsoftwarepakker som SPSS, SAS, STATA, Genstat, samt under anvendelse af R.

Analysen opdeler variationen i datasættet i variationen mellem kønnene, mellem koncentrationerne og i relation til interaktionen mellem kønnene og koncentrationerne. Hvert forhold testes mod et estimat af variationen mellem replikate dyr inden for grupper af dyr af samme køn ved samme koncentration. Fuldstændige oplysninger om den underliggende metode fås i mange statistiske standardlærebøger (jf. referencer) og i hjælpefunktionerne i de statistiske pakker.

Analysen fortsætter med at undersøge interaktionen mellem køn og koncentration i ANOVA-tabellen ⁽¹⁾. Uden en væsentlig interaktion giver de kombinerede værdier på tværs af køn eller koncentrationsniveauer gyldige statistiske test mellem niveauerne baseret på den samlede gruppevariation i ANOVA-tabellen.

Analysen fortsætter med at opdele skønnet af variationen mellem koncentrationer i kontraster, som giver en test for lineære og kvadratiske kontraster mellem respons på tværs af koncentrationsniveauerne. Hvis der er en betydelig interaktion mellem køn og koncentration, kan denne interaktion også indeles i lineære kontraster x køn og kvadratiske kontraster x køn. Dette giver test af, om koncentrationsresponsene er parallelle for de to køn, eller om der er en differentieret respons mellem dem.

Skønnet over den samlede variation i gruppen kan bruges til parvise test af forskellen mellem medianer. Disse sammenligninger kan foretages mellem medianerne for de to køn og mellem medianerne for de forskellige koncentrationsniveauer såsom for sammenligninger med de negative kontrolniveauer. I de tilfælde hvor der er en væsentlig interaktion, kan der foretages sammenligninger mellem medianerne for de forskellige koncentrationer inden for samme køn eller medianerne for de to køn ved samme koncentration.

Referencer

Der findes mange statistiske lærebøger, som diskuterer teori, model, metode, analyse og fortolkning af faktormodeller, lige fra enkle to-faktor-analyser til de mere komplekse modeller, som anvendes ved Design of Experiment-metoder. Her følger en ikke-udtømmende liste. Nogle bøger indeholder bearbejdede eksempler på sammenlignelige modeller, i nogle tilfælde med en kode til at køre analyserne ved hjælp af forskellige softwarepakker.

- (1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.
- (2) Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.
- (3) Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

⁽¹⁾ Statistikere, der anvender en modelleringsmetode såsom f.eks. lineære normale modeller (General Linear Models, GLM) kan have en anden, men sammenlignelig tilgang til analysen, men når ikke nødvendigvis frem til den traditionelle ANOVA-tabel, der er baseret på algoritmiske metoder til beregning af statistik udviklet før computerens indtog.

-
- (4) Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.
 - (5) Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.
 - (6) Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.
 - (7) Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.
-

Tillæg 3

BEGRÆNSNINGER I ASSAYET

På grund af det aktuelle videnniveau er der adskillige begrænsninger forbundet med in vivo-kometassayet. Det forventes, at disse begrænsninger vil blive mindre eller mere snævert defineret, da der er gjort flere erfaringer med at anvende assayet til besvarelse af sikkerhedsspørgsmål i lovgivningssammenhæng.

1. Nogle former for DNA-skader kan være kortvarige, dvs. at de muligvis repareres for hurtigt til, at de kan observeres i 24 timer eller mere efter sidste dosis. Der findes ikke nogen påviselig liste over typer af kortvarige skader, heller ikke over de kemikalier, som kan forårsage denne type skader, og det vides heller ikke, over hvilket tidsrum denne type skader kan påvises. Den/de optimale prøveudtagningstidspunkt/-er kan også være kemikalie- eller rutespecifikke, og prøveudtagningstidspunkter bør bestemmes ud fra kinetiske data (f.eks. det tidspunkt, $T_{\max}$, hvor den maksimale plasma- eller vævskoncentration opnås), når sådanne data foreligger. I de fleste af de valideringsundersøgelser, der underbygger denne forsøgsmetode, blev der foretaget obduktion to eller tre timer efter indgivelse af den sidste dosis. I de fleste undersøgelser i litteraturen indgives den sidste dosis mellem 2 og 6 timer før aflivning. Derfor er disse erfaringer brugt som grundlag for anbefalingen i forsøgsmetoden, nemlig at den sidste dosis, hvis der ikke foreligger data, bør indgives på et angivet tidspunkt mellem 2 og 6 timer før obduktion.
2. Der findes ingen kendte data for undersøgelse af testens følsomhed over for påvisning af kortvarige DNA-skader efter indgivelse i foder eller drikkevand sammenlignet med indgivelse med sonde. DNA-skader er konstateret efter indgivelse i foder og drikkevand, men der er relativt få rapporteringer heraf sammenlignet med den langt større erfaring med indgivelse med sonde og intraperitoneal indgivelse. Assayets følsomhed kan således mindskes for kemikalier, som fremkalder kortvarige skader, når de indgives i foder eller drikkevand.
3. Der er ikke foretaget laboratorieundersøgelser af andet væv end lever og mave, og der er derfor ingen anbefaling til, hvordan der opnås en følsom og reproducerbar respons i andet væv end lever, såsom forventede positive og negative kontrolintervaller. For lever er der heller ikke opnået enighed om at fastsætte en nedre grænse for den negative kontrolværdi.
4. Selv om det fremgår af flere publikationer, at cytotoxicitet har en forvirrende effekt in vitro, findes der meget få data vedrørende cytotoxicitet in vivo, og det er derfor ikke muligt at anbefale en bestemt måling af cytotoxicitet. Histopatologiske forandringer såsom inflammation, celleinfiltration og apoptotiske eller nekrotiske forandringer er blevet associeret med øget DNA-migration, men som påvist i JaCVAM-valideringstesten (OECD, 2014) resulterer disse ændringer ikke altid i positive kometresultater, og der findes derfor ikke en endelig liste over histopatologiske forandringer, som altid er forbundet med øget DNA-migration. Pindsvin (eller skyer, spøgelsesceller) er tidligere blevet foreslået som en indikator for cytotoxicitet, men ætiologien for disse pindsvin er usikker. Nogle data tyder på, at de kan være forårsaget af kemikalierelateret cytotoxicitet, mekanisk/enzym-induceret skade, der er opstået under fremstillingen af prøven (Guerard *et al.* 2014), og/eller en mere ekstrem virkning af testkemikaliets genotoksicitet. Andre data synes at vise, at de skyldes omfattende DNA-skader, som måske kan repareres (Lorenzo *et al.*, 2013).
5. Væv eller cellekerner er med held blevet frosset ned med henblik på senere analyse. Dette resulterer normalt i en målelig virkning på responsen på bærestoffet og den positive kontrol (Recio *et al.*, 2010, Recio *et al.*, 2012, Jensen *et al.*, 2013). Hvis der anvendes nedfrysning, bør laboratoriet dokumentere kompetence med hensyn til nedfrysningsmetoder samt bekræfte acceptable lave intervaller i den procentvise DNA-intensitet i halen i målvæv fra dyr behandlet med bærestof, og at der stadig kan påvises positive responser. Litteraturen indeholder eksempler på forskellige metoder til nedfrysning af væv. På nuværende tidspunkt er der ikke enighed om, hvordan væv bedst nedfryses og optøes, og hvordan det vurderes, om en potentielt ændret respons kan påvirke testens følsomhed.
6. Nyere arbejde viser, at listen over kritiske variabler forventes at blive stedse kortere og parametrene for kritiske variabler mere præcist defineret (Guerard *et al.*, 2014).

Referencer

- (1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, pp. 114-21.
- (2) Jackson, P. *et al.* (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 699-707.
- (3) Lorenzo, Y. *et al.* (2013), **The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead**, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, pp. 427-32.
- (4) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.
- (5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149-62.
- (6) Recio, L. *et al.* (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101-13.«

16) I del C affattes kapitel C.13 således:

»C.13 Bioakkumulering i fisk: Eksponering i vand eller føde

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD's testvejledning (Test Guideline (TG)) 305 (2012). Det overordnede mål med denne revision af forsøgsmetoden er dobbelt. For det første er det hensigten at medtage en test af bioakkumulering i føde⁽¹⁾, der kan anvendes til at bestemme bioakkumuleringspotentialt for stoffer med meget lav vandopløselighed. For det andet er formålet at skabe en forsøgsmetode, hvori der af dyrevelfærdshensyn benyttes færre fisk, når det er muligt, og som er mere omkostningseffektiv.

I årene siden vedtagelsen af den konsoliderede forsøgsmetode C.13 (1) er mange stoffer blevet testet, og der er opnået stor erfaring hos både laboratorier og myndigheder. Dette har ført til den overbevisning, at testen kan gøres mindre kompleks, hvis bestemte kriterier er opfyldt (jf. punkt 88), og at en trinvis fremgangsmåde er mulig. Erfaringerne viser også, at biologiske faktorer såsom vækst og fiskenes fedtindhold kan have stor indflydelse på resultaterne og måske skal tages i betragtning. Dertil kommer, at man har erkendt, at test af stoffer, der er meget tungtopløselige i vand, måske ikke er teknisk gennemførlige. For stoffer med meget lav vandopløselighed i vandmiljøet kan eksponering i vand være af begrænset betydning sammenlignet med eksponering i føde. Dette har ført til udviklingen af en forsøgsmetode, hvor fisk eksponeres for stoffer i foderet (jf. punkt 7-14 og 97 ff). En validering (ringtest) af eksponering i føde blev foretaget i 2010 (51).

De vigtigste ændringer omfatter:

- Test af kun en testkoncentration kan anses for at være tilstrækkelig, når det er sandsynligt, at biokoncentreringsfaktoren (BCF) er uafhængig af testkoncentrationen.
- Et begrænset testdesign for eksponering i vand med et reduceret antal prøveudtagningspunkter er muligt, hvis bestemte kriterier er opfyldt.

⁽¹⁾ Se tillæg 1 for definitioner og enheder

- Fiskens fedtindhold bør måles, så BCF kan udtrykkes på grundlag af et fedtindhold på 5 %.
- Større fokus på skøn over kinetisk BCF (når det er muligt) samt skøn over BCF ved ligevægt.
- For visse stofgrupper foreslås en test med eksponering i foder, når dette anses for at være mere hensigtsmæssigt end en test med eksponering i vand.
- Fiskenes vægt bør måles, således at BCF_k kan korrigeres for vækstfortynding.

Før bioakkumuleringen testes, bør følgende oplysninger om prøvestoffet være kendt:

- a) Analyseteknikkens følsomhed med hensyn til at måle koncentrationer i væv, vand eller foder af både teststof og eventuelle metabolitter (jf. punkt 65).
- b) Opløselighed i vand [TM A.6 (2)]; dette bør bestemmes i overensstemmelse med en metode, som er egnet til det (skønnede) opløselighedsinterval for at opnå en pålidelig værdi. For hydrofobe stoffer vil dette normalt være elueringsmetoden med kolonner.
- c) n-octanol/vand-fordelingskoefficient K_{ow} ⁽¹⁾ [TM A.8 (4), A.24 (5), A.23 (6)], eller andre relevante oplysninger om fordelingsadfærd (f.eks. sorption til lipider, K_{oc}); dette bør bestemmes ved hjælp af en metode, der gør det muligt med det (skønnede) interval for K_{ow} at opnå en pålidelig værdi. For hydrofobe stoffer vil dette normalt være slow-stirring-metoden [TM A.23 (6)].
- d) Stoffets stabilitet i vand (hydrolyse [TM C.7 (7)]).
- e) Stoffets stabilitet i foder (især ved undersøgelser af eksponering i føde).
- f) Oplysninger om fototransformation af relevans for irradiationsbetingelserne i testen (8).
- g) Overfladespænding (dvs. for stoffer, hvor $\log K_{ow}$ ikke kan bestemmes) [TM A.5 (9)]
- h) Damptryk [TM A.4 (10)].
- i) Oplysninger om biotisk eller abiotisk nedbrydning i vand, herunder (men ikke begrænset til) let bionedbrydelighed [TM C.4, del II til VII (11), C.29 (12)], hvor det er relevant
- j) Oplysninger om metabolitter: struktur, $\log K_{ow}$, dannelse og nedbrydelighed, hvis det er relevant.
- k) Syrestyrkekonstant (pK_a) for stoffer, der kan ionisere. Om nødvendigt bør testvandets pH tilpasses for at sikre, at stoffet er ikke-ioniseret i testen, hvis dette er foreneligt med fiskearten.

Uafhængigt af den valgte eksponeringsmetode eller prøveudtagningsplan beskriver denne forsøgsmetode en fremgangsmåde til at karakterisere stoffers bioakkumuleringspotentiale i fisk. Skønt gennemstrømningstestsystemer er langt at foretrække, er semistatiske systemer tilladt, forudsat at validitetskriterierne (jf. punkt 24 og 113) er opfyldt. Ved eksponering i foder er gennemstrømningssystemet ikke nødvendigt for at bevare koncentrationer af teststoffet i vand, men vil bidrage til at bevare passende koncentrationer af opløst ilt, sikre rent vand og fjerne indflydelse fra f.eks. udskillelsesprodukter.

⁽¹⁾ Undertiden benævnt P_{ow} ; bestemt ved hjælp af en rystekolbemetode i TM A.8 (4), en HPLC-metode i TM A.24 (5) og en slow-stirring-metode i TM A.23 (6). Generator-kolonne-teknikken anvendes lejlighedsvis til at bestemme $\log K_{ow}$. Der findes et begrænset antal undersøgelser, hvor denne teknik er brugt, primært til polychlorerede biphenyler og dibenzodioxiner (f.eks. Li and Doucette 1993) (3). For stoffer, der kan ionisere, bør K_{ow} henvises til den ikke-ioniserede form.

Uafhængigt af den valgte forsøgsmetode er denne forsøgsmetode så detaljeret beskrevet, at den kan udføres, samtidig med at der er tilstrækkelig frihed til at tilpasse tilrettelægningsen af forsøgene til forholdene i forskellige laboratorier og til teststofferne forskellige egenskaber. Testen med eksponering i vand anvendes mest hensigtsmæssigt på stabile organiske stoffer med $\log K_{ow}$ -værdier på mellem 1,5 og 6,0 (13), men kan også anvendes på stærkt hydrofobe stoffer ($\log K_{ow} > 6,0$), hvis der kan påvises en stabil og fuldt opløst koncentration af teststoffet i vand. Hvis der ikke kan påvises en stabil koncentration af teststoffet i vand, er en undersøgelse af eksponering i vand ikke hensigtsmæssig, og der vil derfor være behov for at anvende en metode, hvor fiskene eksponeres for teststoffet i foderet (selv om fortolkning og anvendelse af resultaterne af undersøgelsen af eksponering i foder kan afhænge af lovrammerne). Forhåndsskøn over biokoncentreringsfaktoren (BFC, undertiden betegnet K_b) for organiske stoffer med $\log K_{ow}$ -værdier på op til ca. 9,0 kan beregnes med ligningen i Bintein et al. (14). Forhåndsskønnet over biokoncentreringsfaktoren for stærkt hydrofobe stoffer kan være højere end den værdi af ligevægtsbiokoncentreringsfaktoren (BCF_{ss}), der forventes opnået fra laboratorieforsøg, især når der anvendes en enkel lineær model til forhåndsskønnet. Parametre, der karakteriserer bioakkumuleringspotential, omfatter optagelseshastighedskonstanten (k_1), tabshastighedskonstanter, herunder udskillelseshastighedskonstanten (k_2), ligevægtsbiokoncentreringsfaktoren (BCF_{ss}), den kinetiske biokoncentreringsfaktor (BCF_k) og fødebiomagnificeringsfaktoren (BMF) ⁽¹⁾.

Radioaktivt mærkede teststoffer kan gøre analysen af vand-, foder og fiskeprøver lettere og kan benyttes til at bestemme, om der skal foretages identifikation og kvantitativ bestemmelse af metabolitter. Hvis den samlede mængde radioaktivt restmateriale måles alene (f.eks. ved forbrænding eller opløsning af væv), baseres BCF eller BMF på den samlede mængde moderstof, eventuelle tilbageholdte metabolitter og assimileret kulstof. BCF- eller BMF-værdier, der baseres på det samlede indhold af radioaktivt materiale, kan derfor ikke altid sammenlignes direkte med en BCF- eller BMF-værdi, der er bestemt ved specifik kemisk analyse af moderstoffet alene. Adskillelsesprocedurer, f.eks. TLC, HPLC eller GC ⁽²⁾, kan anvendes inden analysen i radioaktivt mærkede undersøgelser til at bestemme BCF eller BMF baseret på moderstoffet. Når der anvendes adskillelseteknikker, bør moderstoffet og relevante metabolitter identificeres og kvantificeres ⁽³⁾ (jf. punkt 65), hvis BCF eller BMF skal baseres på koncentrationen af moderstoffet i fiskene og ikke på de samlede radioaktivt mærkede restkoncentrationer. Man kan også kombinere en undersøgelse af metabolisme i fiskene eller in vivo-fordelingsundersøgelse med en biokoncentrationsundersøgelse ved at analysere og identificere stoffer i væv. Muligheden for metabolisme kan forudsiges ved hjælp af egnede værktøjer (f.eks. OECD's QSAR Toolbox (15) og QSAR-programmer).

Beslutningen om, hvorvidt der skal gennemføres en undersøgelse af eksponering i vand eller føde og under hvilke betingelser, bør baseres på faktorerne i punkt 3 og de relevante rammebestemmelser. Eksempelvis bør man for stoffer med en høj $\log K_{ow}$, men stadig stor vandopløselighed med hensyn til tilgængelige analyseteknikkers følsomhed, i første instans overveje eksponering i vand. Oplysninger om vandopløselighed er dog ikke nødvendigvis endelige for disse hydrofobe typer stoffer, så muligheden for at fremstille stabile, målelige opløste vandige koncentrationer (stabile emulsioner er ikke tilladt) for en test med eksponering i vand bør undersøges, før der træffes en afgørelse om forsøgsmetode (16). Det er ikke muligt at give præcis, præskriptiv vejledning om den metode, der skal anvendes, på grundlag af "cut off"-kriterier som vandopløselighed og octanol/vand-fordelingskoefficient, da andre faktorer (analyseteknikker, nedbrydning, adsorption osv.) af ovennævnte grunde kan have en mærkbar indvirkning på metodens anvendelighed. En $\log K_{ow}$ på over 5 og en vandopløselighed på under ~0,01-0,1 mg/l angiver de stoffer, hvor test med eksponering i vand kan blive vanskeligere.

Andre faktorer, der kan påvirke valget af test, bør indgå i overvejelserne, herunder stoffets potentiale for adsorption til måleglas og apparater, dets stabilitet i en vandig opløsning kontra dets stabilitet i fiskefoder (17) (18) osv.

⁽¹⁾ Se tillæg 1 for definitioner og enheder.

⁽²⁾ TLC: tyndtlagskromatografi, HPLC: højtrykssvæskkromatografi, GC: gaskromatografi.

⁽³⁾ Nogle landes lovgivning kan indeholde krav om analyse af metabolitter, såfremt visse betingelser er opfyldt (jf. punkt 65).

Oplysninger om sådanne praktiske aspekter kan findes i andre afsluttede undersøgelser af eksponering i vand. Yderligere oplysninger om evalueringen af aspekter vedrørende bioakkumuleringsundersøgelser findes i litteraturen (f.eks. (19)).

For stoffer, hvor opløseligheden eller opretholdelsen af koncentrationen i vand samt analysen af disse koncentrationer ikke udgør nogen hindring for gennemførelsen af en test med eksponering i vand, er denne metode at foretrække til bestemmelse af stoffets biokoncentreringspotentiale. Under alle omstændigheder bør det kontrolleres, at den/de relevante koncentrationer ved eksponering i vand ligger inden for stoffets opløselighed i testmediet. Der kan anvendes forskellige metoder til at opretholde stabile koncentrationer af det opløste teststof, såsom brug af stamopløsninger eller passive doseringssystemer (f.eks. kolonne-elueringsmetoden), så længe det kan dokumenteres, at der kan opretholdes stabile koncentrationer, og testmediet ikke ændres fra det, der anbefales i punkt 27.

I tilfælde af stærkt hydrofobe stoffer ($\log K_{ow} > 5$ og en opløselighed på under $\sim 0,01\text{--}0,1$ mg/l) kan det blive vanskeligere at teste ved hjælp af eksponering i vand. Årsager til begrænsninger kan være, at koncentrationen i vand ikke kan holdes på et tilstrækkelig konstant niveau (f.eks. som følge af sorption til eksponeringsbeholdernes glas eller hurtig optagelse i fisken), eller at de koncentrationer i vand, der skal anvendes, er så lave, at de er i samme størrelsesorden som eller under den analytiske kvantificeringsgrænse⁽¹⁾. For disse meget hydrofobe stoffer anbefales en test med eksponering i foder, forudsat at den er i overensstemmelse med de relevante rammebestemmelser og risikovurderinger.

For overfladeaktive stoffer bør det overvejes, om stoffets egenskaber muliggør testen af biokoncentrering ved eksponering i vand; hvis ikke, er en undersøgelse af eksponering i foder sandsynligvis mere hensigtsmæssig. Overfladeaktive stoffer er stoffer, der fungerer som agenser, som sænker grænsefladespændingen mellem to væsker. Deres amfifile karakter (dvs. at de både indeholder en hydrofil og en hydrofob del) får dem til at samle sig ved grænseflader som vand-luft-grænsefladen, vand-foder-grænsefladen og glasvægge, hvilket gør det vanskeligt at bestemme deres koncentration i vand.

Foderundersøgelsen kan omgå nogle af eksponeringsaspekterne ved komplekse blandinger med komponenter af forskellig vandopløselighed, da der her er større sandsynlighed for en sammenlignelig eksponering for alle blandingsbestanddele end ved metoden med eksponering i vand (jf. (20)).

Det bør bemærkes, at metoden med eksponering i foder giver en fødebiomagnificeringsfaktor (BMF), ikke en biokoncentreringsfaktor (BCF)⁽²⁾. Der findes metoder til at anslå en kinetisk biokoncentreringsfaktor (BCF_k) ud fra data fra undersøgelsen med eksponering i føde (som beskrevet i tillæg 8), men disse metoder bør anvendes med forsigtighed. Generelt forudsætter disse tilgange førsteordenskinetik og kan kun anvendes på visse grupper af forbindelser. Det er usandsynligt, at sådanne metoder kan anvendes til overfladeaktive stoffer (jf. punkt 12).

En begrænset prøveopstilling for eksponering i vand med færre prøveudtagningspunkter for at mindske antallet af dyr og/eller ressourcer (jf. punkt 83 ff.) bør kun anvendes på de stoffer, hvor der er grund til at forvente, at optagelse og udskillelse omtrentlig følger førsteordenskinetik (dvs. i almindelige, ikke-ioniserede organiske stoffer, jf. punkt 88).

⁽¹⁾ Generelt bør de målte koncentrationer i vand under optagelsesfasen være mindst af en størrelsesorden, der ligger over kvantificeringsgrænsen, således at mere end en halveringstid af fiskenes belastning kan måles i udskillelsesfasen.

⁽²⁾ Se tillæg 1 for definitioner og enheder.

C.13 — I: Test af biokoncentrering med eksponering af fisk i vand**PRINCIP FOR TESTEN**

Testen består af to faser, en eksponeringsfase (optagelsesfase) og en efterfølgende udskillelsesfase. Under optagelsesfasen eksponeres en gruppe fisk af samme art for teststoffet i en eller flere valgte koncentrationer, afhængigt af teststoffets egenskaber (jf. punkt 49). De overføres dernæst til et medium uden teststof, hvor udskillelsesfasen forløber. Der kræves altid en udskillelsesfase, medmindre der kun har været en ubetydelig optagelse af stoffet i eksponeringsfasen. I begge testfaser følges koncentrationen af stoffet i eller på fiskene (eller specificeret væv deraf). Ud over den eksponerede gruppe holdes der samtidig en kontrolgruppe af fisk under samme betingelser, bortset fra at der ikke er noget teststof til stede, så man kan sammenholde eventuelle skadevirkninger i biokoncentreringstesten med en tilsvarende kontrolgruppe og bestemme baggrundskoncentrationer af teststof ⁽¹⁾.

I testen med eksponering i vand løber optagelsesfasen normalt i 28 dage. Varigheden kan om nødvendigt forlænges (jf. punkt 18) eller afkortes, hvis det kan påvises, at ligevægt er indtrådt tidligere (jf. tillæg 1, definitioner og enheder). Ud fra ligningerne i tillæg 5 kan man forudsige, hvor lang tid optagelsesfasen vil vare, og hvor lang tid der vil gå, inden der opnås ligevægt. Derefter igangsættes udskillelisesperioden, når fiskene ikke længere eksponeres for stoffet, ved at overføre dem til en ren beholder med samme medium, men uden teststof. Når det er muligt, beregnes biokoncentreringsfaktoren både som forholdet mellem koncentrationen i fiskene (C_f) og i vandet (C_w) ved ligevægt, (BCF_{ss} , se tillæg 1, definitioner) og som en kinetisk biokoncentreringsfaktor (BC_{FK} , se tillæg 1, definitioner og enheder), som anslås til at være forholdet mellem hastighedskonstanterne for optagelse (k_1) og udskillelse (k_2), idet kinetikken antages at være af første orden ⁽²⁾.

Hvis der ikke opnås ligevægt inden 28 dage, beregnes BCF enten ved hjælp af den kinetiske tilgang (jf. punkt 38), eller optagelsesfasen kan forlænges. Fører dette til en upraktisk langvarig optagelsesfase, inden ligevægt indtræder (jf. punkt 37 og 38, tillæg 5), foretrækkes den kinetiske metode. Alternativt bør man for meget hydrofobe stoffer overveje en test med eksponering i føde ⁽³⁾, forudsat at en sådan er i overensstemmelse med de relevante rammebestemmelser og risikovurderinger.

Hastighedskonstanten for optagelse, hastighedskonstanten for udskillelse (eller konstanterne, hvis der er tale om mere komplekse modeller), biokoncentreringsfaktoren (ligevægt og/eller kinetisk) og så vidt muligt konfidensgrænser for hver af disse parametre beregnes ud fra den model, der bedst beskriver de målte koncentrationer af teststof i fisk og vand (jf. tillæg 5).

Forøgelsen af antal fisk under prøven vil medføre et fald i koncentrationen af teststoffet i voksende fisk (såkaldt vækstfortynding), og dermed bliver den kinetiske BCF undervurderet, hvis der ikke korrigeres for vækst (jf. punkt 72 og 73).

BCF er baseret på den samlede koncentration i fiskene (dvs. pr. samlet fiskevægt). Til særlige formål kan bestemte vævstyper eller organer (f.eks. muskelvæv eller lever) anvendes, hvis fiskene er tilstrækkeligt store, eller de kan opdeles i en spiselig del (filet) og en ikke-spiselig del (indvolde). Da der for mange organiske stoffer er en tydelig sammenhæng mellem biokoncentreringspotentialt og stoffets hydrofobicitet, er der også en tilsvarende sammenhæng mellem testsfiskenes fedtindhold og stoffernes observerede biokoncentrering. For at mindske denne kilde til udsving i forsøgsresultater for stoffer med høj lipofilitet (dvs. $\log K_{ow} > 3$) bør biokoncentreringen udtrykkes som normaliseret til en fisk med et fedtindhold på 5 % (baseret på den samlede kropsvægt), ud over den, der bestemmes direkte i undersøgelsen. Dette er nødvendigt for at danne grundlag for en sammenligning mellem resultater for forskellige stoffer og/eller fiskearter. 5 % fedtindhold er bredt anvendt, da det er det gennemsnitlige fedtindhold for fisk, som almindeligvis anvendes i denne forsøgsmetode (21).

⁽¹⁾ For de fleste teststoffer bør der ideelt set ikke konstateres teststofkoncentrationer i kontrolvandet. Baggrundskoncentrationer bør kun være relevante for naturligt forekommende materialer (f.eks. visse metaller) og stoffer, der findes overalt i miljøet.

⁽²⁾ Hvis kinetikken tydeligvis ikke er af første orden, bør der tages mere komplekse modeller i brug (jf. henvisningerne i tillæg 5) og søges biostatistisk bistand.

⁽³⁾ Optagelsen kan begrænses af lave eksponeringskoncentrationer på grund af lav vandopløselighed i biokoncentreringstesten, mens højere eksponeringskoncentrationer kan opnås i en undersøgelse med eksponering i foder.

OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

Ud over teststoffets egenskaber som anført i indledningen (afsnit 3) er også andre oplysninger nødvendige såsom toksiciteten for den fiskeart, der bruges i testen, helst den asymptotiske LC_{50} (dvs. tidsuafhængige) og/eller toksicitet skønnet på baggrund af langvarige fisketest (f.eks. TM C.47 (22), C.15 (23) og C.14 (24)).

Der bør være adgang til en passende analysemetode med kendt nøjagtighed, præcision og følsomhed til kvantitativ bestemmelse af stoffet i testopløsninger og i biologisk materiale, sammen med oplysninger om, hvordan prøver fremstilles og opbevares. Den analytiske kvantificeringsgrænse for teststoffet i både vand og fiskevæv bør også være kendt. Når et radioaktivt mærket prøvestof bruges, bør det være så rent som muligt (f.eks. helst > 98 %), og den procentdel af radioaktiviteten, der skyldes urenheder, bør være kendt.

TESTENS GYLDIGHED

Følgende betingelser skal være opfyldt, for at testen betragtes som gyldig:

Udsvingene i vandtemperaturen må ikke overstige ± 2 °C, fordi store afvigelser kan påvirke biologiske parametre af relevans for optagelse og udskillelse samt forårsage stress hos dyrene.

Koncentrationen af opløst ilt må ikke falde til en mætning på under 60 %.

Koncentrationen af teststoffet i kamrene skal ligge inden for ± 20 % af gennemsnittet af de målte værdier i eksponeringsfasen.

Koncentrationen af teststoffet skal være under dets opløselighedsgrænse i vand, idet der tages hensyn til testvandets eventuelle indflydelse på effektiv opløselighed ⁽¹⁾.

Dødeligheden eller andre skadevirkninger/sygdomme i både kontrolfisk og eksponerede fisk udgør under 10 % ved testens afslutning; hvis testen strækker sig over flere uger eller måneder, bør dødeligheden eller andre skadevirkninger i begge fiskegrupper være under 5 % om måneden og højst 30 % i alt. Væsentlige forskelle i gennemsnitlig vækst mellem testen og kontrolgrupperne af udtagne fisk kan være et tegn på, at testkemikaliet har en toksisk virkning.

REFERENCESTOFFER

Anvendelse af referencestoffer med kendt biokoncentreringspotentiale og lav metabolisme kan være nyttigt til at kontrollere forsøgsmetoden, når dette er påkrævet (f.eks. når et laboratorium ikke har erfaring med testen, eller forsøgsbetingelserne er blevet ændret).

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

Det bør omhyggeligt undgås, at der i dele af udstyret er anvendt materialer, som kan opløses eller adsorbere, absorbere eller afgive stoffer og have en skadelig virkning på fiskene. Der kan benyttes rektangulære eller cylindriske standardtanke af kemisk inert materiale og passende størrelse (jf. punkt 43) i forhold til mængden af fisk. Bløde plastslanger bør benyttes mindst muligt. Der bør bruges rør og slanger af polytetrafluorethylen, rustfrit stål eller glas. Erfaringerne har vist, at det til teststoffer med høj adsorptionskoefficient såsom syntetiske pyrethroider kan være nødvendigt at bruge silancoatet glas. I disse tilfælde bør udstyret kasseres efter brug. Det er mest hensigtsmæssigt at udsætte testsystemer for de koncentrationer af teststoffet, der skal bruges i testen, så længe det er nødvendigt for at dokumentere stabile eksponeringskoncentrationer før indførelsen af testorganismer.

⁽¹⁾ For stoffer med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger bør der tages hensyn til vandopløseligheden for hver relevant bestanddel for at bestemme de relevante eksponeringskoncentrationer.

Vand

Til testen benyttes sædvanligvis råvand, som bør være af ensartet kvalitet og stamme fra en ikke-forurenet kilde, men kunstigt fremstillet ferskvand (dvs. demineraliseret vand, der er tilsat specifikke næringsstoffer i kendte mængder) kan være mere egnet til at sikre en ensartet kvalitet over tid. Fortyndingsvandet, dvs. det vand, der blandes med teststoffet, før det hældes i testkarret (jf. punkt 30), bør være af en sådan kvalitet, at den valgte fiskeart kan overleve akklimatiserings- og testperioden, uden at fiskenes udseende eller adfærd bliver unormal. Ideelt set bør det godtgøres, at fiskearten kan overleve, vokse og formere sig i fortyndingsvandet (f.eks. i laboratoriekultur eller en toksicitetstest over en hel livscyklus). Fortyndingsvandet bør mindst beskrives i henseende til pH-værdi, hårdhed, tørstof i alt og organisk kulstof i alt (TOC ⁽¹⁾), og gerne også indhold af ammonium, nitrit og nitrat, samt for saltvandsfisk saltholdighed. Selv om det er velkendt, hvilke parametre der er vigtige for fisks velfærd, er der i tillæg 2 anført anbefalede maksimumkoncentrationer for en række parametre for fersk- og saltvand, der bruges til test.

Vandet bør være af konstant kvalitet under hele forsøget. Dets pH bør være mellem 6,0 og 8,5 ved forsøgets start, men for en given test bør det ligge konstant inden for $\pm 0,5$. For at sikre, at fortyndingsvandet ikke ubehørigt påvirker forsøgsresultatet (f.eks. ved kompleksdannelse med teststoffet) eller indvirker negativt på fiskebestanden, bør der regelmæssigt tages prøver til analyse og som minimum ved forsøgets start og afslutning. Tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), de vigtigste anioner og kationer (f.eks. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , K^{+} , Cl^{-} og SO_4^{2-}), pesticider (f.eks. samlet mængde phosphor- og chlorholdige organiske pesticider), samlet mængde organisk kulstof og opslæmmede faststoffer bør bestemmes f.eks. hver tredje måned, såfremt man ved, at fortyndingsvandet har en relativt konstant kvalitet. Hvis fortyndingsvandets kvalitet påviseligt har været konstant over mindst et år, kan analyserne foretages mindre hyppigt og med større intervaller (f.eks. hver sjette måned).

Både det naturlige partikelindhold og det samlede indhold af organisk kulstof i fortyndingsvandet bør være så lavt som muligt, så man undgår adsorption af teststoffet til organisk materiale, hvilket kan nedsætte dets biotilgængelighed og dermed resultere i en undervurdering af BCF. Den højeste acceptable værdi er 5 mg/l for partikler (tørstof, der ikke passerer et 0,45 μm filter) og 2 mg/l for organisk kulstof i alt (jf. tillæg 2). Om nødvendigt bør vandet filtreres inden brug. Bidraget til indholdet af organisk kulstof i testvandet fra testfisk (ekskrementer) og føderester bør holdes så lavt som muligt (jf. punkt 46).

Testopløsninger

Der fremstilles en stamopløsning af teststoffet med en passende koncentration. Den bør fremstilles ved simpelthen at hælde teststoffet i vand og derefter omryste blandingen. Et alternativ kan i visse tilfælde være at bruge et fastfasedesorptionsdoseringssystem. Anvendelse af opløsningsmidler og dispergeringsmidler (opløsende stoffer) anbefales normalt ikke (jf. (25)); anvendelse af disse materialer kan dog være acceptabel til at fremstille en passende koncentreret stamopløsning. Det bør dog så vidt muligt undgås at benytte sådanne materialer, og deres kritiske micellekoncentration bør ikke overskrides (hvis det er relevant). Opløsningsmidler, der kan anvendes, er acetone, ethanol, methanol, dimethylformamid og triethylenglycol. Anvendte dispergeringsmidler er Tween 80, methylcellulose 0,01 % og HCO-40. Opløsningsmidlets koncentration i det endelige testmedium bør være den samme i alle behandlinger (dvs. uanset teststoffets koncentration) og bør ikke overstige de tilsvarende toksicitetsgrænseværdier for opløsningsmidlet under de givne forsøgsbetingelser. Den maksimale koncentration er 100 mg/l (eller 0,1 ml/l). Det er usandsynligt, at en koncentration af opløsningsmidlet på 100 mg/l i væsentlig grad vil ændre den maksimale opløste prøvestofkoncentration, der kan opnås i mediet (25). Opløsningsmidlets og testkemikaliet bidrag til det samlede indhold af organisk kulstof i testvandet bør være kendt. Under hele testen bør koncentrationen af den samlede mængde organisk kulstof i testbeholderne ikke overstige koncentrationen af organisk kulstof hidrørende fra teststoffet og et eventuelt opløsningsmiddel eller opløsende stof ⁽²⁾ med mere end 10 mg/l (± 20 %). Indholdet af organiske stoffer kan have en betydelig virkning på mængden af frit opløst teststof i gennemstrømningstest med fisk, især for stærkt lipofile stoffer. Fastfase-mikroekstraktion (jf. punkt 60) kan give

⁽¹⁾ TOC omfatter organisk kulstof fra partikler og opløst organisk kulstof, dvs. $\text{TOC} = \text{POC} + \text{DOC}$.

⁽²⁾ Selv om det normalt ikke anbefales at anvende et opløsningsmiddel eller et opløsende stof, bør det organiske kulstof fra dette middel tilsættes det organiske kulstof fra teststoffet for at vurdere koncentrationen af organisk kulstof i testkarrene.

vigtige oplysninger om forholdet mellem bundne og frit opløste forbindelser, hvoraf sidstnævnte antages at repræsentere den biotilgængelige fraktion. Prøvestoffets koncentration bør være under teststoffets opløselighedsgrænse i testmediet trods brug af et opløsningsmiddel eller et opløsende stof. Der bør udvises forsigtighed ved brug af let bionedbrydelige opløsningsmidler, da de kan skabe problemer med bakterievækst i gennemstrømningstest. Hvis det ikke er muligt at fremstille en stamopløsning uden brug af opløsende stof, bør der tages hensyn til det hensigtsmæssige i en test med eksponering i vand i modsætning til i føde.

Til gennemstrømningstest kræves der et system, som kontinuerligt leverer og fortynder en stamopløsning af teststoffet (f.eks. doseringspumpe, proportionalfortynder eller mætningssystem), eller et fastfase-desorptionsdoseringssystem til tilførsel af testkemikaliet til testkamrene. Der tilstræbes en udskiftning på mindst fem gange dagligt pr. testkammer. Gennemstrømningsmetoden bør foretrækkes, men kan det ikke lade sig gøre (f.eks. hvis testorganismerne tager skade), kan der bruges en semistatisk teknik, forudsat at validitetskriterierne er opfyldt (jf. punkt 24). Stamopløsningernes og fortyndingsvandets flowhastigheder bør kontrolleres 48 timer før testens begyndelse og derefter mindst dagligt under testen. Ved denne kontrol måles flowhastigheden i hvert testkammer, og det sikres, at det ikke varierer med mere end 20 %, hverken i det enkelte kammer eller mellem kamrene.

Valg af art

Blandt de vigtige kriterier ved valg af fiskeart er, at den skal være let at få fat i, kunne fås i passende størrelser og let kunne holdes i laboratoriet. Andre kriterier for valg af fiskeart kan være dens rekreative, kommercielle eller økologiske betydning, dens følsomhed i forhold til andre arter og gode erfaringer med den. I tillæg 3 findes en liste over nogle fiskearter, som anbefales til test. Der kan anvendes andre arter, men forsøgsmetoden må i så fald tilpasses, så testbetingelserne bliver passende. Brug af andre arter og en anden undersøgelsesmetode bør i så fald begrundes. Generelt afkorter brugen af små fisk tiden indtil ligevægt, men der kan være behov for flere fisk (prøver) til at sikre en passende analyse af fedtindholdet og teststofkoncentrationer i fiskene. Desuden kan forskelle i åndedrætsrytme og metabolisme mellem unge og ældre fisk hæmme sammenligninger af resultaterne fra forskellige undersøgelser og testarter. Det bør bemærkes, at fiskearter, der testes gennem et (ungfiske)livsstadium med hastig vækst, kan komplicere fortolkningen af data.

Opbevaring af fisk (relevant for eksponering i vand og føde)

Stampopulationen af fisk bør akklimatiseres i mindst to uger i vand ved testtemperaturen (jf. punkt 28) og hele tiden have tilstrækkeligt foder (jf. punkt 45). Både vand og føde bør være af samme type som det, der anvendes under testen.

Efter en 48-timers tilpasningsperiode registreres dødeligheden, og der anvendes følgende kriterier:

- dødelighed på over 10 % af populationen efter syv dage: hele fiskegruppen forkastes
- dødelighed på mellem 5 og 10 % af populationen efter syv dage: akklimatiseringen fortsættes i endnu syv dage
 - hvis der er mere end 5 % dødelighed i løbet af de følgende syv dage, kasseres hele fiskegruppen
- dødelighed under 5 % af populationen på syv dage: fiskegruppen accepteres.

Det bør sikres, at ingen af fiskene til testen har synlige sygdomme eller misdannelser. Syge fisk bør kasseres. Fisk bør ikke behandles mod sygdomme hverken under eller i to uger forud for testen.

TESTENS UDFØRELSE

Forprøve

Det kan være nyttigt at gennemføre et indledende eksperiment for at optimere testbetingelserne for den endelige test, f.eks. valg af koncentration(er) af teststoffet og længden af eksponerings- og udskillelsesfasen, eller bestemme, om der skal foretages en komplet test. Forprøven bør udformes på en sådan måde, at de nødvendige oplysninger kan indhentes. Det kan overvejes, om en begrænset test kan være tilstrækkelig til at beregne en BCF, eller om der er behov for en komplet test (jf. punkt 83-95 om den begrænsede test).

Eksponeringsbetingelser*Optagelsesfasens længde*

Optagelsesfasens længde kan forudsiges på grundlag af praktiske erfaringer (f.eks. fra en tidligere undersøgelse eller en akkumuleringsundersøgelse af et andet kemisk stof, der er strukturelt tilsvarende) eller ved hjælp af forskellige empiriske sammenhænge ud fra kendskab til teststoffets opløselighed i vand eller dets octanol/vand-fordelingskoefficient (forudsat at optagelsen følger førsteordenskinetik, se tillæg 5).

Optagelsesfasen bør være 28 dage, medmindre det kan godtgøres, at der inden da er indtrådt ligevægt (jf. tillæg 1, Definitioner og enheder). Man taler om ligevægtstilstand i plottet over teststoffet i fisk (C_f) mod tid, når kurven bliver parallel med tidsaksen, når tre på hinanden følgende analyser af C_f i prøver, der er udtaget med mindst to dages mellemrum, ligger inden for $\pm 20\%$ af hinanden, og når der ikke er nogen signifikant stigning i C_f i tid mellem den første og den sidste vellykkede analyse. Ved pooling af prøver til analyse kræves der mindst fire på hinanden følgende analyser. For teststoffer, der optages langsomt, vil et interval på syv dage være mere passende. Hvis ligevægt ikke er indtrådt inden 28 dage, beregnes BCF enten ved hjælp af den kinetiske tilgang alene, hvilket ikke afhænger af, at der opnås ligevægt, eller optagelsesfasen forlænges, idet der foretages yderligere målinger, indtil der opnås ligevægt, eller i 60 dage, alt efter hvilken periode der er kortest. Teststoffets koncentration i fiskene ved afslutningen af optagelsesfasen skal også være tilstrækkelig høj til at sikre et pålideligt skøn over k_2 fra udskillelsesfasen. Hvis der ikke kan påvises en signifikant optagelse efter 28 dage, kan testen afbrydes.

Udskillelsesfasens længde

For stoffer, der følger førsteordenskinetik, er en periode på halvdelen af optagelsesfasen normalt nok til at opnå et passende fald (f.eks. 95 %) i fiskenes belastning med stoffet (jf. redegørelsen for skønnet i tillæg 5). Hvis der skal bruges urealistisk lang tid til at opnå et fald på 95 %, f.eks. dobbelt så lang tid som en normal optagelsesfase (dvs. over 56 dage), kan tidsrummet sættes ned (f.eks. indtil koncentrationen af testkemikaliet er mindre end 10 % af ligevægtskoncentrationen). For stoffer med mere komplekse optagelses- og udskillelsesmønstre end det, hvor fisken betragtes som en helhed, og hvor der gælder førsteordenskinetik, må der dog benyttes en længere udskillelsesfase til bestemmelse af hastighedskonstanterne. Hvis der påvises og/eller forventes sådanne komplekse mønstre, anbefales det at søge råd fra en biostatistiker og/eller farmakokinetiker med henblik på at sikre en korrekt prøveopstilling. I takt med at udskillelsesperioden forlænges, kan antallet fisk til prøveudtagning blive en begrænsning, og væksthorskel mellem fiskene kan påvirke resultaterne. Periodens længde vil også blive bestemt af, hvor længe koncentrationen af teststoffet i fiskene overstiger den analytiske kvantificeringsgrænse.

Antal testfisk

Der udvælges så mange fisk pr. testkoncentration, at der mindst er fire fisk til rådighed pr. prøve ved hvert prøveudtagningspunkt. Fisk bør kun pooles, hvis det ikke er muligt at analysere enkelte fisk. Hvis hensigten er at opnå højere præcision i fitningen af kurver (og afledte parametre), eller hvis metabolismeundersøgelser (f.eks. for at skelne mellem metabolitter og moderstof, når der anvendes radioaktivt mærkede prøvestoffer), er der behov for flere fisk pr. prøveudtagningspunkt. Fedtindholdet bør bestemmes på det samme biologiske materiale, som benyttes til at bestemme teststoffets koncentration. Hvis dette ikke er muligt, kan der blive behov for flere fisk (jf. punkt 56 og 57).

Hvis der anvendes voksne (dvs. kønsmodne) fisk, bør de ikke være i gydealderen eller have gydt for nylig (dvs. at de allerede har gydt) hverken før eller under testen. Det bør også anføres i rapporten, om der er brugt hanner, hunner eller begge køn i eksperimentet. Hvis begge køn er anvendt, bør det påvises, at forskelle i vækst og fedtindhold mellem kønnene ikke er signifikante inden eksponeringen, navnlig hvis det forventes, at det er nødvendigt at poole han- og hunfisk for at sikre påviselige stofkoncentrationer og/eller fedtindhold.

Til en given test udvælges fisk med samme vægt, således at den mindste ikke vejer mindre end to tredjedele af den største. Alle fisk bør være af samme årgang og komme fra samme kilde. Da fiskenes alder og vægt undertiden kan indvirke signifikant på BCF-værdierne (12), bør disse oplysninger noteres nøjagtigt. Det anbefales, at man kort inden testens start danner sig et skøn over gennemsnitsvægten ved at veje en delprøve af fiskebestanden (jf. punkt 61).

Belastning

Der bør være et højt fisk-til-vand-forhold, så faldet i koncentrationen af testblandingen i vand som følge af overførsel af fiskene bliver så lavt som muligt, og for at undgå fald i koncentrationen af opløst ilt. Det er vigtigt, at belastningen afpasses efter den anvendte fiskeart. I alle tilfælde anbefales normalt en fisk-til-vand-belastning på 0,1-1,0 g fisk (vådvægt) pr. liter vand pr. dag. Fisk-til-vand-belastningen kan sættes op, hvis det godtgøres, at den nødvendige koncentration af teststof kan fastholdes inden for $\pm 20\%$, og at koncentrationen af opløst ilt ikke kommer under en mætning på 60 % (jf. punkt 24).

Der skal tages hensyn til fiskeartens normale levevilkår ved valget af belastning. Eksempelvis kan bundfisk kræve et akvarium med større bundareal for samme vandrumfang sammenlignet med pelagiske fiskearter.

Fodring

Under akklimatiserings- og testperioder gives fiskene passende foder med kendt fedt- og proteinindhold i en sådan mængde, at de forbliver sunde og bevarer deres legemsvægt (en vis vækst er tilladt). Fisk fodres dagligt under akklimatiserings- og testperioder i et bestemt omfang, der afhænger af den anvendte art, forsøgsbetingelserne og foderets brændværdi (f.eks. ca. 1 til 2 % af kropsvægten pr. dag for regnbueørred). Fodermængden bør fastsættes på en sådan måde, at hurtig vækst og stor stigning i fedtindholdet undgås. For at sikre samme fodring bør fodermængden omberegnes, f.eks. en gang om ugen. Til denne beregning kan man skønne vægten af fiskene i de enkelte kamre ud fra vægten af de fisk, der senest er taget op fra det pågældende kammer. De fisk, der bliver tilbage i kamrene, må ikke vejes.

Hver dag kort efter fodringen ($\frac{1}{2}$ -1 time) bør overskydende foder og ekskrementer suges op fra testkamrene. Kamrene bør holdes så rene som muligt under testen for at sikre den lavest mulige koncentration af organisk kulstof (jf. punkt 29), eftersom tilstedeværende organisk kulstof kan nedsætte teststoffets biotilgængelighed (12).

Da meget foder er fremstillet af fiskemel, bør det sikres, at foderet ikke påvirker testresultaterne eller fremkalder skadelige virkninger, f.eks. fordi det indeholder (spor af) pesticider, tungmetaller og/eller teststoffet selv.

Lys og temperatur

Det anbefales, at lysperioden er 12-16 timer, og temperaturen ($\pm 2^\circ\text{C}$) bør være afpasset efter testfiskenes art (jf. tillæg 3). Belysningens type og karakteristika bør være kendt. Man bør være opmærksom på en eventuel fotokemisk omdannelse af teststoffet under undersøgelsens lysforhold. Der bør benyttes en passende belysning, hvor det undgås, at fisk udsættes for kunstigt fremkaldte fotokemiske omdannelsesprodukter. Det kan i nogle tilfælde være hensigtsmæssigt at afblænde UV-stråling under 290 nm med et filter.

Testkoncentrationer

Testen er oprindeligt udviklet til ikke-polære organiske stoffer. For denne type stof forventes eksponering af fisk for en enkelt koncentration at være tilstrækkeligt, da der ikke påregnes koncentrationsvirkninger, selv om to koncentrationer kan være påkrævet i henhold til den gældende lovgivning. Hvis stoffer uden for dette område undersøges, eller andre tegn på mulig koncentrationafhængighed er kendt, bør testen udføres med to koncentrationer mere. Hvis kun en koncentration testes, bør dette begrundes (jf. punkt 79). Den testede koncentration bør være så lav, som er praktisk eller teknisk muligt (dvs. ikke tæt på opløselighedsgrænsen).

I visse tilfælde kan det forventes, at et stofs biokoncentrering afhænger af koncentrationen i vandet (f.eks. af metaller, hvor optagelsen i fisk i det mindste delvist kan reguleres). I sådanne tilfælde skal mindst to, men helst flere koncentrationer af miljømæssigt relevans testes (jf. punkt 49). For stoffer, hvor de testede koncentrationer af praktiske grunde skal ligge tæt på opløselighedsgrænsen, anbefales det at teste mindst to koncentrationer, da dette kan give et indblik i eksponeringskoncentrationernes pålidelighed. Valget af testkoncentrationer bør omfatte den miljømæssigt realistiske koncentration samt den koncentration, der er relevant for formålet med den konkrete vurdering.

Den/de valgte koncentration/-er af teststoffet bør være under teststoffets kroniske virkning eller 1 % af dets akutte asymptotiske LC_{50} inden for et miljømæssigt relevant interval og mindst i en størrelsesorden over dets kvantificeringsgrænse i vand ved anvendelse af analysemetoden. Den højeste tilladte testkoncentration kan også bestemmes ved at dividere den akutte 96 h LC_{50} med et passende akut/kronisk forhold (f.eks. er passende forhold for nogle kemiske stoffer over 3, mens få er over 100). Hvis der anvendes en anden koncentration, bør den adskille sig fra ovenstående med en faktor på 10. Hvis dette ikke er muligt på grund af toksicitetskriteriet (som begrænser den højeste testkoncentration) og den analytiske grænse (som begrænser den laveste testkoncentration) kan en lavere faktor end 10 anvendes, og det bør overvejes at anvende radioaktivt mærket teststof (af den størst mulige renhed, f. eks. helst > 98 %). Det bør sikres, at de anvendte koncentrationer ikke overstiger teststoffets opløselighedsgrænse i testmedierne.

Kontroller

Ud over teststrækken bør der være en kontrol med fortyndingsvand (jf. punkt 30-31) eller, hvis det er relevant, en kontrol med et opløsningsmiddel.

Hyppighed af målinger af vandkvaliteten

Under testen bør opløst ilt, TOC, pH og temperatur måles i alle test- og kontrolbeholdere. Samlet hårdhedsgrad og saltindhold (hvis relevant) bør måles i kontrollerne og i en beholder. Hvis to eller flere koncentrationer testes, måles disse parametre ved den højeste koncentration. Som minimum bør opløst ilt og saltholdighed (hvis det er relevant) måles tre gange — ved begyndelsen, midt i og ved afslutningen af optagelsesperioden — og en gang ugentligt i udskillelisesperioden. TOC bør måles ved testens begyndelse (24 timer og 48 timer før igangsættelse af optagelsesfasen), før fiskene overføres, og mindst en gang ugentligt i både optagelses- og udskillelisesfasen. Temperaturen bør måles og registreres dagligt, pH ved begyndelsen og afslutningen af hver periode, og hårdhed en gang pr. test. Temperaturen bør helst følges kontinuerligt i mindst et af karrene.

Prøveudtagning og analyse af fisk og vand

Plan for udtagning af prøver af fisk og vand

Der bør, inden fiskene overføres, udtages vandprøver fra testkamrene med henblik på bestemmelse af teststofkoncentrationen, både i optagelses- og i udskillelsesfasen. Vandprøven bør tages før fodring, samtidig med at der udtages fiskeprøver. Hyppigere prøveudtagning kan være nyttig for at sikre stabile koncentrationer efter overførslen af fiskene. I optagelsesfasen bør teststofkoncentrationen bestemmes for at kontrollere, at validitetskriterierne er opfyldt (jf. punkt 24). Hvis analyser af vandet fra starten af udskillelsesfasen viser, at der ikke er påvist teststof, kan dette bruges som begrundelse for ikke at måle test- og kontrolvand for teststof i den resterende del af udskillelsesfasen.

Der bør udtages prøver af fisk mindst fem gange i optagelsesfasen og mindst fire gange i udskillelsesfasen med henblik på analyse for teststof. Da det i nogle tilfælde vil være vanskeligt at foretage et rimeligt præcist skøn over BCF-værdien ud fra dette prøveantal (især hvis det formodes, at udskillelsen ikke følger en simpel førsteorden-soptagelse og -kinetik), kan det anbefales at øge prøveudtagningshyppigheden i begge perioder (jf. bilag 4).

Fedtindholdet bør mindst ved optagelsesfasens start og afslutning og udskillelsesfasens afslutning bestemmes på det samme biologiske materiale, som benyttes til bestemmelse af teststoffets koncentration. Hvis dette ikke er muligt, bør der udtages mindst tre uafhængige fisk for at bestemme fedtindholdet på hvert af de samme tre tidspunkter. Antal fisk pr. tank ved forsøgets start bør tilpasses i overensstemmelse hermed ⁽¹⁾. Hvis der alternativt ikke påvises betydelige mængder teststof i kontrolfiskene (dvs. fisk fra stampopulationen), kan det være tilstrækkeligt at analysere kontrolfiskene fra testen for fedtindhold, og analysen for teststoffet i testgruppen/-erne (og den dermed forbundne hastighedskonstant, udskillelseskonstant og BCF-værdi(er)) kan korrigeres for ændringer ifølge kontrolgruppens fedtindhold i løbet af testen ⁽²⁾.

Døde eller syge fisk bør ikke analyseres for teststof eller fedtkoncentration.

I tillæg 4 er der vist et eksempel på en acceptabel prøveudtagningsplan. Der kan let opstilles andre planer til at beregne eksponeringstider for 95 % optagelse ud fra andre antagne K_{ow} -værdier (der henvises til tillæg 5 for beregninger).

Prøveudtagningen bør fortsættes under optagelsesfasen, indtil der er opnået ligevægt (se tillæg 1, definitioner og enheder); ellers afsluttes optagelsesfasen (efter 28 eller 60 dage, jf. punkt 37 og 38). Før udskillelsesfasen bør fiskene overføres til rene kar.

Udtagning og forberedelse af prøver

Der bør udtages vandprøver til analyse, f.eks. ved opugning gennem et rør af inert materiale fra et sted midt i testkammeret. Hverken filtrering eller centrifugering synes altid at kunne adskille den ikke-biotilgængelige fraktion af teststoffet fra den biotilgængelige. Hvis der anvendes en separationsteknik, bør testrapporten altid indeholde en begrundelse for eller validering af denne på grund af vanskelighederne med biotilgængelighed (25). Især for stærkt hydrofobe stoffer (dvs. stoffer med $\log K_{ow} > 5$) (12) (26), hvor der kan opstå adsorption til filtermatricen eller centrifugering i beholdere, bør prøverne ikke gennemgå disse behandlinger. I stedet bør tankene holdes så rene som muligt (jf. punkt 46), og det samlede indhold af organisk kulstof følges under såvel optagelses- som udskillelsesfasen (jf. punkt 53). For at undgå eventuelle problemer med nedsat biotilgængelighed kan der udtages prøver ved hjælp af fastfase-mikroekstraktionsteknikker, hvis stofferne er tungtopløselige og stærkt hydrofobe.

⁽¹⁾ Hvis fedtindholdet ikke analyseres i samme fisk som teststoffet, bør fiskene mindst have samme vægt og (hvis relevant) samme køn.

⁽²⁾ Dette alternativ er kun gyldigt, hvis fiskene i alle testgrupper holdes i grupper med fisk af ensartet størrelse, samt at de fjernes efter samme mønster og fodres på samme måde. Dette sikrer en ensartet vækst i alle fisketestgrupper, hvis den testede koncentration ligger under grænsen for toksicitet. Hvis væksten er den samme, forventes fedtindholdet også at være det samme. En anden vækst i kontrolgruppen ville være tegn på, at stoffet har haft en effekt, og gøre undersøgelsen ugyldig.

De udtagne fisk bør aflives straks ved hjælp af den mest hensigtsmæssige og humane metode (til målinger af hele fisk skylles de blot i vand og tørres (jf. punkt 28)) Fisken vejes, og den samlede længde måles ⁽¹⁾. I hver enkelt fisk bør den målte vægt og længde forbindes med den analyserede stoffkoncentration (og fedtindhold, hvis det er relevant), f.eks. ved hjælp af en entydig identifikatorkode for hver udtagen fisk.

Fiske- og vandprøver skal helst analyseres umiddelbart efter udtagningen, så man undgår nedbrydning eller andre former for tab, og så der løbende under testen kan beregnes omtrentlige optagelses- og udskilleleshastigheds-konstanter. Ved at foretage analyserne med det samme opdager man straks, når et plateau (ligevægt) er indtrådt.

Foretages analyserne ikke med det samme, bør prøverne opbevares hensigtsmæssigt. Inden undersøgelsen påbegyndes, indhentes der oplysninger om, hvordan det pågældende teststof bør opbevares, f.eks. dybfrysning, opbevaring ved 4 °C, ekstraktion osv. Det sikres, at teststoffet ikke opbevares så længe, at det nedbrydes under opbevaring.

Analysemetodens kvalitet

Da hele proceduren i vid udstrækning afhænger af analysemetodens nøjagtighed, præcision og følsomhed, kontrolleres det eksperimentelt, at analysen af stoffet giver tilfredsstillende nøjagtighed, præcision, reproducerbarhed og genfindning af teststoffet i både vand og fisk for den valgte metode. Dette bør være en del af indledende forsøg. Det kontrolleres tillige, at teststoffet ikke kan påvises i det anvendte fortyndingsvand. Om nødvendigt korrigeres de værdier af teststoffkoncentrationer i vand og fisk, der er fundet under testen, for genfindning og baggrundsværdier i kontrollerne. Fiske- og vandprøver behandles hele tiden på en sådan måde, at kontaminering og tab (f.eks. på grund af adsorption til prøveudtagningsudstyret) mindskes mest muligt.

Analyse af fiskeprøver

Hvis der i testen anvendes radioaktivt mærket materiale, kan man analysere for det samlede indhold af radioaktivitet (dvs. det oprindelige stof og dets metabolitter), eller prøverne kan oprenses, så de oprindelige stof kan analyseres særskilt. Hvis BCF skal baseres på det oprindelige stof, bør de vigtigste metabolitter som minimum karakteriseres ved optagelsesfasens afslutning (jf. punkt 6). De vigtigste metabolitter er dem, som udgør ≥ 10 % af de samlede restkoncentrationer i fiskevæv, som udgør ≥ 5 % ved to på hinanden følgende prøveudtagningspunkter, som udviser et stigende niveau i hele optagelsesfasen, og som er kendetegnet ved kendte toksikologiske betænkeligheder. Hvis BCF for hele fisk udtrykt i samlet radioaktivt mærket restindhold er ≥ 500 , kan det være tilrådeligt — og kraftigt tilrådeligt for visse kategorier af stoffer såsom pesticider — at identificere og kvantificere de vigtigste metabolitter. Kvantificering af disse metabolitter kan være et krav fra nogle regulerende myndigheder. Hvis nedbrydningsprodukter, der udgør ≥ 10 % af radioaktivt mærket restindhold i alt i fiskevævet, identificeres og bestemmes kvantitativt, anbefales det at gøre det samme for nedbrydningsprodukter i testvandet. Hvis dette ikke er muligt, bør der redegøres herfor i rapporten.

Normalt bør koncentrationen af teststoffet bestemmes i hver enkelt fisk efter vejning. Hvis dette ikke er muligt, kan prøverne fra hver prøveudtagning pooles, men pooling indskrænker mulighederne for statistisk behandling af dataene; der bør derfor medtages et passende antal fisk i testen, således at den ønskede pooling, statistiske procedure og power opnås. Reference (27) og (28) kan anvendes som en introduktion til relevante poolingprocedurer.

⁽¹⁾ Ud over vægt bør den samlede længde registreres, da sammenligning af omfanget af længdeforøgelse i løbet af testen er en god indikator for, om der er indtruffet skadelige virkninger.

BCF bør udtrykkes som normaliseret i forhold til en fisk med 5 % fedtindhold (baseret på vådvægt) ud over det, der er direkte udledt af undersøgelsen (jf. punkt 21), medmindre det kan fremføres, at teststoffet ikke primært opkoncentreres i fedtstoffer. Fiskenes fedtindhold bør om muligt bestemmes ved hver prøveudtagning og helst på samme ekstrakt, som er benyttet til analyse for teststoffet, eftersom lipiderne ofte skal fjernes fra ekstraktet, inden det kan analyseres ved kromatografi. En analyse af teststoffer kræver dog ofte særlige ekstraktionsprocedurer, som kan være i strid med forsøgsmetoderne til bestemmelse af fedtindhold. I dette tilfælde (indtil der findes egnede, ikke-destruktive instrumentelle metoder) anbefales det at anvende en anden strategi til at bestemme fiskenes fedtindhold (jf. punkt 56). Fedtindholdet bør bestemmes ved hjælp af egnede metoder (20). Teknikken til ekstraktion med chloroform/methanol (29) kan anbefales som standardmetode (30), men Smedes-metoden (31) anbefales som alternativ teknik. Sidstnævnte metode er kendetegnet ved en sammenlignelig ekstraktionseffektivitet, stor nøjagtighed, anvendelse af mindre giftige organiske opløsningsmidler og brugervenlighed. Andre metoder, hvis nøjagtighed svarer til de anbefalede metoders, kan anvendes, hvis det er behørigt begrundet. Det er vigtigt at give nærmere oplysninger om, hvilken metode der er benyttet.

Måling af fiskenes vækst

Ved testens begyndelse skal 5-10 fisk fra stampopulationen vejes enkeltvis, og deres samlede længde måles. Det kan være de samme fisk, der anvendes til analyse af fedtindhold (jf. punkt 56). Vægt og længde af fisk, der bruges til hver prøveudtagning fra både test- og kontrolgrupper, bør måles før kemisk analyse eller analyse af fedtindhold. Målingerne af disse udtagne fisk kan anvendes til at anslå vægten og længden af de fisk, der bliver tilbage i test- og kontroltanke (jf. punkt 45).

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

Teststoffets optagelseskurve bør fås ved at plote dets koncentration i/på fiskene (eller bestemt væv) under optagelsesfasen mod tid (lineære akser). Hvis kurven har nået et plateau, dvs. at den er omtrent parallel med tidsaksen, beregnes BCF (BCF_{ss}) i ligevægtstilstand ved hjælp af følgende:

$$\frac{C_f \text{ ligevægt(gnsn.)}}{C_w \text{ ligevægt(gnsn.)}}$$

Udviklingen af C_f kan påvirkes af fiskenes vækst (jf. punkt 72 og 73). Den gennemsnitlige eksponeringskoncentration (C_w) påvirkes af variationer over tid. Det kan forventes, at en tidsvægtet gennemsnitskoncentration er mere relevant og præcis med henblik på bioakkumuleringsundersøgelser, selv om variationen ligger inden for et passende gyldighedsinterval (jf. punkt 24). En tidsvægtet gennemsnitlig (TWA) vandkoncentration kan beregnes i henhold til tillæg 5, afsnit 1.

Biokoncentreringsfaktoren (BCF_k) beregnes som forholdet k_1/k_2 , de to førsteordenskinetiske hastighedskonstanter. Hastighedskonstanterne k_1 og k_2 og BCF_k kan udledes ved samtidig at fitte resultaterne af optagelses- og udskillelsesfasen. Alternativt kan k_1 og k_2 bestemmes fortløbende (se tillæg 5 for en beskrivelse og sammenligning af disse metoder). Hastighedskonstanten for udskillelse (k_2) skal måske korrigeres for vækstfortynding (jf. punkt 72 og 73). Hvis optagelses- og/eller udskillelseskurven tydeligvis ikke er af første orden, må der tages mere komplekse modeller i brug (se henvisningerne i tillæg 5) og søges bistand fra en biostatistiker eller farmakokinetiker.

Data om fisks vægt/længde

De enkelte fisks vådvægt og samlede længder for alle prøveudtagningsintervaller opstilles i tabelform for test- og kontrolgrupper i optagelses- og udskillelsesfasen (herunder stampopulation for optagelsesfasen). For hver enkelt fisk bør den målte vægt og længde forbindes med den analyserede kemikaliekoncentration, f.eks. ved hjælp af en entydig identifikatorkode for hver udtagne fisk. Vægt er det foretrukne mål for vækst med henblik på at korrigere kinetiske BCF-værdier for vækstfortynding (se punkt 73 og tillæg 5 for den metode, der anvendes til at korrigere data for vækstfortynding).

Korrigerende for vækstfortynding og lipidnormalisering

Fiskenes vækst i udskillelsesfasen kan sænke målte koncentrationer af kemikalier i fiskene, hvilket betyder, at den samlede udskillelseskonstant (k_2) er større, end den ville have været ved rene fjernelsesprocesser (f.eks. åndedræt, stofskifte eller egestion). Kinetiske biokoncentreringsfaktorer bør korrigeres for vækstfortynding. En BCF_{ss} vil også blive påvirket af vækst, men der findes ingen vedtagen procedure til at korrigere en BCF_{ss} for vækst. I tilfælde af stor vækst bør man også udlede BCF_K korrigeret for vækst (BCF_{K_g}), da denne værdi kan være mere relevant til at måle biokoncentreringsfaktoren. Fedtindholdet i testfiskene (som hænger tæt sammen med bioakkumuleringen af hydrofobe stoffer) kan variere nok i praksis, således at det er nødvendigt at normalisere til et fast fedtindhold (5 % vægt/vægt) for at fremlægge både en kinetisk biokoncentreringsfaktor og en ligevægtsbiokoncentreringsfaktor på en meningsfuld måde, medmindre det kan hævdes, at teststoffet ikke primært opkoncentreres i fedtvæv (f.eks. kan visse perfluorerede stoffer binde til proteiner). Ligninger og eksempler på disse beregninger kan ses i tillæg 5.

For at korrigere en kinetisk BCF for vækstfortynding bør hastighedskonstanten korrigeres for vækst. Denne vækstkorrigerede udskillelseshastighedskonstant (k_{2g}) beregnes ved at trække væksthastighedskonstanten (k_g fra de målte vægtdata) fra den samlede udskillelseshastighedskonstant (k_2). Den vækstkorrigerede kinetiske biokoncentreringsfaktor beregnes derefter ved at dividere optagelseshastighedskonstanten (k_1) med den vækstkorrigerede udskillelseshastighedskonstant (k_{2g}) (jf. tillæg 5). I nogle tilfælde kan denne metode medføre visse risici. For meget langsomt udskilte stoffer, der testes i hurtigt voksende fisk, kan den afledte k_{2g} f.eks. være meget lille, og dermed bliver fejlprocenten i de to hastighedskonstanter, der er brugt til at beregne den, kritiske, og i nogle tilfælde kan skøn over k_g overstige k_2 . I en alternativ tilgang, der omgår behovet for korrigerende for vækstfortynding, anvendes udskillelsesdata for teststofmasse pr. fisk (hel) i stedet for de normale (koncentrations)data for teststofmængde pr. enhed fiskemasse. Dette kan nemt opnås, da test i henhold til denne TM bør forbinde registrerede vævskoncentrationer og den enkelte fisks vægt. En enkel procedure hertil er beskrevet i tillæg 5. Bemærk, at k_2 stadig bør rapporteres, også hvis det er den alternative metode, der anvendes.

Den kinetiske biokoncentreringsfaktor og ligevægtsbiokoncentreringsfaktoren anføres også i forhold til et standard-fedtindhold på 5 % (vægt/vægt), medmindre det kan hævdes, at teststoffet ikke primært opkoncentreres i fedtvæv. Fiskekoncentrationsdata eller BCF normaliseres ifølge forholdet mellem 5 % og det faktiske gennemsnitlige (individuelle) fedtindhold (i % vådvægt) (jf. tillæg 5).

Hvis samme fisk er blevet analyseret for kemikalier og fedtindhold, bruges normaliserede data for de individuelle fisks fedtindhold til at beregne en lipidnormaliseret BCF. Hvis der alternativt er samme vækst hos kontrolfisk og eksponerede fisk, kan det være tilstrækkeligt kun at anvende fedtindholdet til korrigerende for fedtindhold (jf. punkt 56). En metode til beregning af en lipidnormaliseret BCF er beskrevet i tillæg 5.

Fortolkning af resultater

Hvis der i prøveopløsninger måles koncentrationer nær analysemetodens påvisningsgrænse, bør resultaterne fortolkes med forsigtighed.

Gennemsnitlig vækst i både test- og kontrolgrupper bør i princippet, for at udelukke toksiske virkninger, ikke adskille sig væsentligt fra hinanden. Væksthastighedskonstanterne eller vækstkurverne for de to grupper sammenlignes med en passende procedure ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Der kan foretages en t-test på væksthastighedskonstanterne for at undersøge, om der er forskelle i væksten mellem kontrol- og testgrupper, eller en F-test i tilfælde af variansanalyse. Der kan om nødvendigt gennemføres en F-test eller sandsynlighedskvotienttest som hjælp til at vælge en passende vækstmodel (OECD's monografi 54, (32)).

Skarpe optagelses- og udskillelseskurver er tegn på biokoncentreringsdata af høj kvalitet. For hastighedskonstanterne bør resultatet af en χ^2 -egnethedstest vise god egnethed (dvs. en lille målingsfejlprocent (32)) for bioakkumuleringsmodellen, således at hastighedskonstanterne kan betragtes som pålidelige (jf. tillæg 5). Hvis der anvendes mere end en testkoncentration, bør forskellen i optagelses- og udskillelseskonstanter mellem testkoncentrationerne være under 20 % (⁽¹⁾). Hvis dette ikke er tilfældet, kan der anføres koncentrationsafhængighed. Signifikante forskelle i optagelses-/udskillelseshastighedskonstanter mellem de anvendte testkoncentrationer bør noteres og om muligt forklares. Normalt ligger konfidensgrænserne for BCF-værdier i veltilrettelagte undersøgelser på ± 20 % af den afledte BCF.

Hvis to eller flere koncentrationer testes, bruges resultaterne fra begge eller alle koncentrationer til at undersøge, om resultaterne er konsekvente, og til at vise, om der er koncentrationsafhængighed. Hvis der kun testes en koncentration for at mindske anvendelsen af dyr og/eller ressourcer, begrundes dette.

Den deraf resulterende BCF_{ss} er tvivlsom, hvis BCF_k -værdien er betydeligt større end BCF_{ss} , da dette kan være en indikation af, at der ikke er indtrådt ligevægt, eller af at der ikke er taget hensyn til vækstfortynding og tabsprocesser. I tilfælde, hvor BCF_{ss} er meget højere end BCF_k , bør udledningen af hastighedskonstanterne for optagelse og udskillelse kontrolleres for fejl og revurderes. En anden fitningsprocedure kan forbedre skønnet over BCF_k (jf. tillæg 5).

Testrapport

Bortset fra teststofoplysningerne i punkt 3 skal testrapporten indeholde følgende:

Teststof:

fysisk form og, hvor det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber

- data for kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder i det omfang, det er relevant og praktisk muligt, osv. (herunder evt. organisk kulstofindhold)
- for stoffer med flere bestanddele og UVCB (kemiske stoffer af ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologiske materialer), så vidt muligt en beskrivelse af de enkelte bestanddeles kemiske identitet og for hver enkelt dens procentuelle andel af den samlede stofmasse. Hvordan den analysemetode, der anvendes i testen, afspejler en måling af stoffets koncentration, bør sammenfattes; alle analytiske procedurer bør beskrives, herunder metodens nøjagtighed, metodens detektionsgrænse og kvantificeringsgrænse
- hvis stoffet er radioaktivt mærket, de mærkede atomers nøjagtige position og den procentdel af radioaktiviteten, der skyldes urenheder
- oplysninger om teststoffets toksicitet for fisk (helst testarten). Toksiciteten angives som en akut 96-h LC_{50} og en NOAEC & LOAEC fra en længerevarende undersøgelse (dvs. test af tidlige livsstadier eller en fuld livscyklustest, hvis en sådan findes)
- opbevaringsbetingelser for testkemikaliets eller teststoffets og testkemikaliets eller teststoffets stabilitet under opbevaringsbetingelserne, hvis disse opbevares før brug.

Testart:

dens videnskabelige navn, stamme, kilde, eventuel forbehandling, akklimatisering, alder, køn (hvis relevant), størrelse (vægt og længde) osv.

(⁽¹⁾) Disse procentsatser er baseret på, at analysemetoderne er pålidelige, og at halveringstiden er < 14 dage. Hvis analysemetoderne er mindre pålidelige, eller halveringstiden er (meget) længere, bliver disse tal større.

Testbetingelser:

- testprocedure (f.eks. gennemstrømning eller semistatisk), regelmæssig undersøgelse eller begrænset prøve (herunder begrundelse)
- belyningskildens art og karakteristika og belyningsperiodernes varighed
- testdesign (f.eks. testkamrenes antal og størrelse, vandudskiftningsinterval, belastning, antal replikater, antal fisk pr. replikat, antal testkoncentrationer, optagelses- og udskillelsesfasens længde samt hyppighed for udtagning af fiske- og vandprøver)
- metode til fremstilling af stamopløsninger og fornyelseshyppighed (hvis der benyttes opløsningsmiddel, oplyses dets koncentration og bidrag til testvandets indhold af organisk kulstof) eller beskrivelse af alternativt doseringssystem
- de nominelle testkoncentrationer, gennemsnittet af de målte værdier og deres standardafvigelser i testkarrene, samt hvilken metode og hyppighed der er benyttet til bestemmelsen
- kilde til fortyndingsvand, beskrivelse af en eventuel forbehandling, resultater af forsøg til bekræftelse af, at fiskene kan leve i vandet, og vandets egenskaber: pH, hårdhedsgrad, temperatur, koncentration af opløst ilt, restindhold af chlor (hvis målt), samlet mængde organisk kulstof, opslæmmet tørstof, testmediets saltindhold (hvis relevant) samt alle andre målinger
- kvaliteten af vandet i testkarrene, pH, hårdhed, samlet mængde organisk stof, temperatur og koncentration af opløst ilt, anvendte metoder og hyppighed af målinger
- detaljerede oplysninger om fodring (f.eks. foderets type, kilde og sammensætning (som minimum fedt- og proteinindhold hvis muligt) samt fodermængde og fodringshyppighed)
- oplysninger om, hvordan fiske- og vandprøver er behandlet, herunder fremstilling, opbevaring, ekstraktion og analysemetoder (og præcision) for teststof og fedtindhold (hvis bestemt)
- metoder anvendt til behandling, randomisering og fordeling af fisk i testkar
- dato for tilførsel af testorganismer til testopløsninger og testens varighed
- beskrivelse af undersøgelser til bestemmelse af dosisinterval og resultater, hvis disse forefindes.

Resultater:

- resultater af en eventuel forprøve
- dødelighed for kontrolfiskene og fiskene i hvert enkelt eksponeringskammer samt eventuel observeret unormal adfærd
- oplysninger om eventuelle negative virkninger
- fuldstændig beskrivelse af alle kemiske analyseprocedurer, herunder detektions- og kvantificeringsgrænser samt variation og genfinding
- fedtindholdet i fiskene, herunder den anvendte metode og (hvis beregnet) faktor for normalisering af fedtindhold (L_n , faktor, der udtrykker resultater vedrørende fedtindhold på 5 %)
- i tabelform: data for vægt (og længde) i tilknytning til koncentrationen af kemikalier i de enkelte fisk (og fedtindhold, hvis det er relevant), både for kontrol- og eksponeringsgrupper (f.eks. ved at anvende unikke identifikatorer for hver udtagen fisk) og beregninger for afledte væksthastighedskonstant(er)
- i tabelform: data for teststofkoncentration i fisk (C_f , i tilknytning til de enkelte fisk) og vand (C_w) (med middelværdier for test- og kontrolgruppe, standardafvigelse og interval, hvis det er relevant) for alle prøveudtagningstidspunkter (C_f udtrykt i mg/kg vådvægt af hele fisken eller specificeret væv deraf, f.eks. fedtvæv, og C_w i mg/l) C_w -værdier for kontrolrækker (baggrundsværdier oplyses)

- kurver (og alle målte data), der viser følgende (eventuelle koncentrationer kan udtrykkes både i forhold til hele kroppen og fedtindholdet normaliseret til 5 % af dyret eller specificeret væv deraf):
 - vækst, dvs. fiskens vægt i forhold til tid eller vægt transformeret ved uddragelse af den naturlige logaritme i forhold til tid (herunder den afledte væksthastighedskonstant k_g)
 - optagelse og udskillelse af teststoffet i fiskene (på én graf)
 - tiden til ligevægt (hvis indtrådt)
 - koncentration transformeret ved uddragelse af den naturlige logaritme i forhold til optagelsestid (herunder den afledte optagelseshastighedskonstant k_1)
 - koncentration transformeret ved uddragelse af den naturlige logaritme i forhold til udskillelsestid (herunder den afledte udskillelseshastighedskonstant k_2) og
 - kurver for både optagelses- og udskillelsesfasen, der viser data og den fittede model
- hvis en visuel undersøgelse af en kurve viser tydeligt ekstreme værdier, kan der anvendes en statistisk gyldig test for ekstreme værdier for at fjerne falske datapunkter, ledsaget af en dokumenteret begrundelse for, at de udelades
- ligevægtsbiokoncentreringsfaktoren (BCF_{ss}), hvis der (næsten) er indtrådt ligevægt
- den kinetiske biokoncentreringsfaktor (BCF_k) og de deraf afledt optagelses- og udskillelseshastighedskonstanter k_1 og k_2 sammen med varianser i k_2 (hældning og skæringspunkt), hvis der anvendes sekventiel fitting
- konfidensgrænser, standardafvigelse (hvis en sådan forefindes) og metoder til beregning/dataanalyse for hver parameter for hver koncentration af det anvendte teststof
 - oplysninger om radioaktivt mærket prøvestof, metabolitter og akkumulering deraf
 - væksthastighedskonstant(er) (herunder konfidensinterval(ler) på 95 %) og beregnet vækstkorrigeret udskillelseshastighedskonstant (k_{2g}), halveringstid og BCF-værdier (BCF_{kg})
 - alle usædvanlige omstændigheder ved testen, eventuelle afvigelser fra proceduren samt alle andre relevante oplysninger
- en sammenfattende oversigt over relevante målte og beregnede data som følger:

Stoffers optagelses- og udskillelseshastighedskonstanter og biokoncentreringsfaktorer (BCF)	
k_g (væksthastighedskonstant, dag ⁻¹):	Indsæt værdi (95 % CI) ⁽¹⁾
k_1 (samlet optagelseshastighedskonstant, l kg ⁻¹ dag ⁻¹):	Indsæt værdi (95 % CI) ⁽¹⁾
k_2 (samlet udskillelseshastighedskonstant, dag ⁻¹):	Indsæt værdi (95 % CI) ⁽¹⁾
k_{2g} (vækstkorrigeret udskillelseshastighedskonstant, dag ⁻¹):	Indsæt værdi (95 % CI) ⁽¹⁾
C_f (koncentration af kemikalie i fiskene ved ligevægt, mg kg ⁻¹):	Indsæt værdi ± SD ⁽²⁾
C_w (koncentration af kemikalie i vand, mg l ⁻¹):	Indsæt værdi ± SD ⁽²⁾
L_n (lipidnormaliseringsfaktor):	Indsæt værdi ⁽³⁾

Stoffers optagelses- og udskillelshastighedskonstanter og biokoncentreringsfaktorer (BCF)	
BCF _{ss} (ligevægt BCF, l kg ⁻¹)	Indsæt værdi ± SD ⁽²⁾
BCF _{ssl} (lipidnormaliseret ligevægts-BCF, l kg ⁻¹):	Indsæt værdi ⁽³⁾ ± SD ⁽²⁾
BCF _k (kinetisk BCF, l kg ⁻¹)	Indsæt værdi (95 % CI) ⁽¹⁾
BCF _{kg} (vækstkorrigeret kinetisk BCF, l kg ⁻¹)	Indsæt værdi (95 % CI) ⁽¹⁾
T _{1/2G} (vækstkorrigeret halveringstid, dag):	Indsæt værdi (95 % CI) ⁽¹⁾
BCF _{kl} (lipidnormaliseret kinetisk BCF, l kg ⁻¹):	Indsæt værdi
BCF _{kl} (lipidnormaliseret vækstkorrigeret kinetisk BCF, l kg ⁻¹):	Indsæt værdi

⁽¹⁾ CI: konfidensinterval (hvor det er muligt at anslå).
⁽²⁾ SD: standardafvigelse (hvor det er muligt at anslå).

Resultater, der rapporteres som "ikke påvist/kvantificeret ved påvisnings-/kvantificeringsgrænsen" ved udvikling af forprøve og forsøgsdesign bør undgås, da sådanne resultater ikke kan benyttes til beregning af hastighedskonstanter.

C.13 — II: Begrænset test med eksponering af fisk i vand

INDLEDNING

Den stigende erfaring med at gennemføre og fortolke den komplette test, både hos laboratorier og tilsynsmyndigheder, viser, at førsteordenskinetik — med nogle få undtagelser — anvendes til at skønne optagelses- og udskillelshastighedskonstanter. Optagelses- og udskillelshastighedskonstanter kan anslås med et minimum af prøveudtagningspunkter, hvorefter den kinetiske BCF kan beregnes.

Det oprindelige formål med at undersøge alternative design for BCF-undersøgelser var at udvikle en lille test, der skal anvendes i et mellemliggende testtrin med henblik på at afvise eller bekræfte BCF-skøn baseret på K_{ow} og QSAR og dermed fjerne behovet for en komplet test af mange stoffer samt minimere omkostningerne og antallet af forsøgsdyr ved at reducere antallet af prøveudtagninger og analytiske sekvenser. Den primære design for den foregående forsøgsmetode sigter mod at gøre det muligt at integrere testresultater i eksisterende BCF-data og lette udførelsen af test og datafortolkning og samtidig formidle tilstrækkeligt nøjagtige og præcise BCF-skøn med henblik på afgørelser om risikovurdering. Mange af de samme overvejelser som ved den komplette test er gældende, f.eks. validitetskriterier (jf. punkt 24) og afslutning af en prøve, hvis der konstateres ubetydelig optagelse ved denne fases afslutning (jf. punkt 16 og 38).

Stoffer, som ville kunne indgå i det begrænsede testdesign, bør henhøre under det generelle område, som denne forsøgsmetode er udviklet til, dvs. ikkepolære organiske stoffer (jf. punkt 49). Hvis der er tegn på, at det stof, der skal testes, kan udvise en anden adfærd (f.eks. en klar afvigelse fra førsteordenskinetik), bør der foretages en komplet test i tilsynsøjemed.

Den begrænsede test udføres typisk ikke over en kortere periode end BCF-standardtesten, men omfatter færre udtagninger af fiskeprøver (se tillæg 6 for begrundelsen). Udskillelsesperioden kan dog afkortes for stoffer, der udskilles hurtigt, for at undgå, at koncentrationerne i fiskene falder til under detektions-/kvantificeringsgrænsen før prøvens afslutning. En begrænset test for eksponering af fisk med en enkelt koncentration kan bruges til at afgøre, om der er behov for en komplet test, og hvis de deraf resulterende data, som bruges til at beregne hastighedskonstanterne og BCF, er robuste (jf. punkt 93), kan man undlade at gennemføre en komplet test, hvis den resulterende BCF ikke nødvendiggør forskrifter.

I nogle tilfælde kan det være en fordel at foretage den begrænsede test med mere end en koncentration som en foreløbig test for at fastslå, om BCF-skøn for et stof er koncentrationsafhængige. Hvis BCF-skønnene fra den begrænsede test viser koncentrationsafhængighed, er det nødvendigt at foretage en komplet test. Hvis BCF-skønnene på grundlag af en sådan begrænset test viser sig ikke at være koncentrationsafhængige, men resultaterne ikke betragtes som endelige, kan eventuelle efterfølgende komplette test udføres med en enkelt koncentration, hvilket vil reducere brugen af dyr sammenlignet med en komplet test med to (eller flere) koncentrationer.

Stoffer, der potentielt kan anvendes i den begrænsede test, bør:

- med en vis sandsynlighed udvise omtrentlig optagelses- og udskillelseskinetik af første orden, f.eks. udledt ved analogislutning med lignende stoffer
- have en $\log K_{ow} < 6$, medmindre der forventes en hurtig metabolisme⁽¹⁾.
- være tilstrækkeligt vandopløselige med hensyn til den analytiske teknik (jf. punkt 24)
- være klart kvantificerbare (dvs. at koncentrationer mindst bør ligge en størrelsesorden over kvantificeringsgrænsen), både i fisk og vand, radioaktiv mærkning anbefales (jf. punkt 23)
- have en udskillelsesperiode, der er længere end stoffets forventede halveringstid (jf. tillæg 5 vedrørende beregninger), eller udskillelsesfasens længde bør tilpasses i overensstemmelse hermed (jf. punkt 91). En undtagelse fra denne regel er tilladt, hvis der forventes hurtig metabolisme af stoffet.

PRØVEUDTAGNINGSPLAN FOR BEGRÆNSEDE UNDERSØGELSER

Udtagning af fiskeprøver

Udtagningen af fiskeprøver er reduceret til fire prøveudtagningspunkter:

- i midten og slutningen af optagelsesfasen (sidstnævnte svarer desuden til udskillelsesfasens begyndelse), f.eks. efter 14 og 28 dage (33).
- i midten af udskillelsesfasen og ved undersøgelsens afslutning (hvor stoffets koncentration er $< 10\%$ af den maksimale koncentration, eller i det mindste har passeret en halveringstid for stoffet), f.eks. 7 og 14 dage efter udskillelse (33). Hvis der forventes eller observeres hurtig udskillelse, kan det være nødvendigt at afkorte udskillelsesperioden for at undgå, at koncentrationerne i fiskene falder til under kvantificeringsgrænsen
- måling af fedtindhold som i en komplet test
- korrigering for vækst som i en komplet test.
- BCF beregnes som en kinetisk BCF.

Udtagning af vandprøver

For begrænsede test udtages der stikprøver af vand som i en komplet test (jf. punkt 54) eller mindst fem gange jævnt fordelt over optagelsesfasen og ugentligt i udskillelsesfasen.

⁽¹⁾ Den begrænsede test kan faktisk bruges til at påvise hurtig metabolisme, når det er kendt, at hurtig metabolisme er sandsynlig.

Ændringer af testdesign

Under hensyntagen til teststoffets egenskaber, gyldige QSAR-forudsigelser og med undersøgelsens specifikke formål kan visse ændringer i undersøgelsens design tages i betragtning:

- Hvis der er behov for større præcision, kan der anvendes flere fisk (6 eller 8 i stedet for 4) til prøven ved optagelsesfasens slutning.
- Medtagelse af en "ekstra" gruppe fisk, hvis udskillelse efter 14 dage (eller ved udskillelsesfasens forventede afslutning) ikke har været tilstrækkelig til at sikre en passende udskillelse (dvs. > 50 %). Hvis den forventede udskillelsesfase er over eller under 14 dage, tilpasses prøveudtagningsplanen (dvs. en gruppe af fisk ved udskillelsesfasens forventede afslutning og en gruppe efter halvdelen af denne fase).
- Brug af to testkoncentrationer for at undersøge mulig koncentrationsafhængighed. Hvis resultaterne af den begrænsede test udført med to testkoncentrationer viser, at BCF er ikke koncentrationsafhængig (dvs. afviger under 20 %), kan en testkoncentration anses for at være tilstrækkelig i en komplet test, hvis en sådan gennemføres.
- Det forekommer sandsynligt, at modeller for bioakkumuleringsprocesser som foreslået af Arnot et al. (35) kan anvendes som en hjælp til planlægningen af optagelses- og udskillelsesfasens længde (se også tillæg 5).

Beregninger

Begrundelsen for denne fremgangsmåde er, at biokoncentreringsfaktoren i en komplet test enten kan bestemmes som en ligevægtsbiokoncentreringsfaktor (BCF_{ss}) ved at beregne forholdet mellem teststoffets koncentration i fiskenes væv og i vand, eller ved at beregne den kinetiske biokoncentreringsfaktor (BCF_k) som forholdet mellem optagelseshastighedskonstanten k_1 og udskillelseshastighedskonstanten k_2 . BCF_k er gyldig, selv om et stofs ligevægtskoncentration ikke opnås under optagelsesfasen, forudsat at optagelse og udskillelse omtrent fungerer i henhold til kinetiske processer af første orden. Som et absolut minimum skal der være to datapunkter til at anslå optagelses- og udskillelseshastighedskonstanter, et ved optagelsesfasens afslutning (dvs. ved udskillelsesfasens begyndelse) og et ved udskillelsesfasens afslutning (eller efter en stor del af den). Det anbefales at bruge det mellemste prøveudtagningspunkt til at kontrollere optagelses- og udskillelseskinetikken ⁽¹⁾. Der henvises til tillæg 5 og 6 for beregninger.

Fortolkning af resultaterne

For at vurdere testens gyldighed og informationsværdi kontrolleres det, at udskillelisesperioden overstiger en halveringstid. Desuden bør BCF_{km} (kinetisk BCF beregnet ud fra en begrænset test) sammenlignes med den begrænsede BCF_{ss} -værdi (der er BCF_{ss} beregnet ved optagelsesfasens afslutning, idet det forudsættes, at ligevægt er indtrådt. Dette kan kun være et skøn, da der ikke er tilstrækkeligt mange prøveudtagningspunkter til at dokumentere dette). Hvis $BCF_{km} < \text{minimeret } BCF_{ss}$, bør den minimerede BCF_{ss} være den foretrukne værdi. Hvis BCF_{km} er under 70 % af den minimerede BCF_{ss} , er resultaterne ikke gyldige, og der bør foretages en komplet test.

Hvis den begrænsede test giver et BCF_{km} i nærheden af en værdi, der nødvendiggør forskrifter, bør der gennemføres en komplet test. Hvis resultatet er langt fra at nødvendiggøre forskrifter (værdien ligger langt over eller under det niveau, der nødvendiggør forskrifter), er en komplet test måske ikke nødvendig, eller der kan gennemføres en enkelt komplet test, hvis dette kræves i henhold til den relevante lovgivning.

Hvis en komplet test er nødvendig efter en begrænset test med en koncentration, kan denne udføres ved en anden koncentration. Hvis resultaterne er konsekvente, kan man afstå fra at gennemføre en yderligere test ved en anden koncentration, da stoffets biokoncentrering ikke forventes at være koncentrationsafhængig. Hvis den begrænsede test er foretaget ved to koncentrationer, og resultaterne viser, at der ikke er koncentrationsafhængighed, kan den komplette test gennemføres med kun en koncentration (jf. punkt 87).

⁽¹⁾ Når der kun måles to datapunkter, kan der foretages skøn over konfidensgrænserne for BCF_{km} ved hjælp af bootstrap-metoder. Når der også er mellemliggende datapunkter, kan konfidensgrænserne for BCF_{km} beregnes som i en komplet test.

Testrapport

Testrapporten om den begrænsede test bør indeholde alle de oplysninger, der kræves for den komplette test (jf. punkt 81), med undtagelse af oplysninger, det ikke er muligt at udarbejde (dvs. en kurve, der viser tiden indtil ligevægt, og ligevægtsbiokonzentreringsfaktoren; for sidstnævnte anføres den minimerede BCF_{ss} i stedet). Endvidere bør den også indeholde begrundelsen for at bruge den begrænsede test og den deraf følgende BCF_{km} .

C.13 — III: Test af bioakkumulering ved eksponering af fisk for teststof i føde

INDLEDNING

Den metode, der er beskrevet i dette afsnit, bør anvendes for stoffer, hvor metoden med eksponering i vand ikke kan gennemføres (f.eks. fordi det ikke er muligt at opretholde stabile, målbare koncentrationer i vand, eller fordi passende belastninger ikke kan nås inden for 60 dage efter eksponering. Se foregående afsnit om metoden til eksponering i vand). Det bør dog bemærkes, at endepunktet fra denne test er en biomagnificeringsfaktor ved eksponering i føde (BMF) og ikke en biokonzentreringsfaktor (BCF) ⁽¹⁾.

I maj 2001 blev en ny metode til test af bioakkumulering af tungtopløselige organiske stoffer præsenteret på SETAC Europe-konferencen, der fandt sted i Madrid (36). Dette arbejde bygger på forskellige bioakkumuleringsundersøgelser i litteraturen, hvor der er anvendt en doseringsmetode, som omfatter spiked foder (f.eks. (37)). I begyndelsen af 2004 fik en EU-PBT-arbejdsgruppe forelagt et udkast til en protokol (38) om måling af bioakkumuleringspotentialer for tungtopløselige organiske stoffer, som den almindelige biokonzentreringsmetode med eksponering i vand ikke kan anvendes på, sammen med et baggrundsdokument (39). En yderligere begrundelse for metoden var, at den potentielle miljømæssige eksponering for så tungtopløselige stoffer (dvs. $\log K_{ow} > 5$) i vid udstrækning kan ske i føden (jf. (40) (41) (42) (43) (44)). Af denne grund henvises der til test af eksponering i føde i nogle forordninger om kemikalier ⁽²⁾. Det skal dog bemærkes, at eksponering i vandfasen omhyggeligt undgås i den metode, der er beskrevet her, og en BMF-værdi fra denne forsøgsmetode kan derfor ikke umiddelbart sammenlignes med en BMF-værdi fra en feltundersøgelse (hvor eksponering i vand og føde kan kombineres).

Denne del af denne forsøgsmetode er baseret på denne protokol (38) og er en ny metode, som ikke er med i den tidligere udgave af TM C.13. Denne alternative test gør det muligt direkte at undersøge eksponering i føde under kontrollerede laboratorieforhold.

Potentielle forskere henvises til pkt. 1 til 14 i denne forsøgsmetode for oplysninger om, hvornår testen med eksponering i føde foretrækkes frem for test med eksponering i vand. Det tilrådes at læse disse overvejelser om forskellige stoffer, før en test gennemføres.

Brug af radioaktivt mærkede teststoffer kan gøres til genstand for de samme overvejelser som ved metoden med eksponering i vand (jf. punkt 6 og 65).

Metoden med eksponering i føde kan bruges til at teste mere end et stof i en enkelt test, så længe visse kriterier er opfyldt; disse uddybes i punkt 112. For nemheds skyld beskrives her en forsøgsmetode, hvor der kun er anvendt et teststof.

Testen med eksponering i føde svarer i mange henseender til testen med eksponering i vand, idet den indlysende undtagelse er eksponeringsvejen. Mange aspekter af den her beskrevne metode overlapper derfor med metoden med eksponering i vand, der er beskrevet i det foregående afsnit. Der er krydshenvist til relevante punkter i det foregående afsnit, i det omfang det er muligt, men af hensyn til læsbarheden og forståelsen er en vis overlapning uundgåelig.

⁽¹⁾ Se tillæg 1 for definitioner og enheder.

⁽²⁾ I forbindelse med anvendelsen af forordning (EF) nr. 1907/2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH) (EUT L 396 af 30.12.2006, s. 1) behandles dette spørgsmål i vejledningen om oplysningskrav og kemikaliesikkerhedsvurderinger, kapitel R.7c, R.7.10.3.1, R.7.10.4.1, og figur R7.10-2.

PRINCIP FOR TESTEN

Gennemstrømningsbetingelser eller semistatiske betingelser kan anvendes (jf. punkt 4); gennemstrømningsbetingelser anbefales for at begrænse den potentielle eksponering for teststoffet i vand som følge af desorption fra spiked foder eller fæces. Testen består af to faser: optagelse (foder spiked med teststof) og udskillelse (rent, ubehandlet foder) (jf. punkt 16). I optagelsesfasen fodres en "testgruppe" af fisk dagligt med en forudfastlagt kost bestående af almindeligt fiskefoder med en kendt sammensætning, der er spiked med teststoffet. Fiskene bør ideelt set indtage alt foderet (jf. punkt 141). Fiskene fodres derefter med det rene, ubehandlede, almindelige fiskefoder i udskillelsesfasen. Som med metoden med eksponering i vand kan der anvendes mere end en testgruppe spiked med forskellige teststofkoncentrationer, hvis det er nødvendigt, men en gruppe er tilstrækkeligt for de fleste meget hydrofobe organiske teststoffer (jf. punkt 49 og 107). Hvis der anvendes semistatiske betingelser, bør fiskene overføres til et nyt medium og/eller et nyt testkammer ved optagelsesfasens afslutning (hvis det medium og/eller apparat, der anvendes i eksponeringsfasen, har været forurenet med prøvestoffet på grund af udvaskning). Koncentrationerne af teststoffet i fiskene måles i begge testfaser. Ud over den fiskegruppe, der har fået spiked føde (testgruppen), skal der være en kontrolgruppe af fisk, som lever under identiske betingelser og fodres på samme måde, bortset fra at det kommercielle fiskefoder ikke er spiked med teststof. Denne kontrolgruppe gør det muligt at kvantificere teststoffets baggrundsværdier i ueksponerede fisk og tjener som sammenligningsgrundlag for eventuelle behandlingsrelaterede skadelige virkninger i testgruppen(-erne) ⁽¹⁾. Samtidig bliver det muligt at sammenligne væksthastighedskonstanter mellem grupper for at kontrollere, at fiskene har ædt samme mængder foder (potentielle forskelle i forskelligt foders smag bør også indgå i forklaringerne på forskelle i hastighedskonstanter for vækst, jf. punkt 138). Det er vigtigt, at test- og kontrolgrupperne får foder med samme næringsværdi under både optagelses- og udskillelsesfasen.

Det er på baggrund af erfaringer fra metodeudviklere påvist, at en optagelsesfase på 7-14 dage normalt er tilstrækkeligt (38) (39); dette burde mindske omkostningerne ved testen og samtidig sikre tilstrækkelig eksponering for de fleste stoffer. I nogle tilfælde kan optagelsesfasen dog forlænges (jf. punkt 127). Under optagelsesfasen når stofkoncentrationen i fiskene ikke nødvendigvis op på ligevægt, hvorfor databehandling og resultater fra denne metode normalt er baseret på en kinetisk analyse af restkoncentrationer i væv. (Bemærkning: Ligninger for skøn over tid indtil ligevægt kan anvendes her som ved testen med eksponering i vand — se tillæg 5). Udskillelsesfasen begynder, når fiskene første gang fodres med foder uden teststof, og varer typisk i op til 28 dage, eller indtil teststoffet ikke længere kan kvantificeres i hele fisk, idet det først indtrufne gælder. Udskillelsesfasen kan forkortes eller forlænges ud over 28 dage afhængigt af ændringer over tid i målte kemiske koncentrationer og fiskenes størrelse.

Denne metode gør det muligt at bestemme den stofs specifikke halveringstid ($t_{1/2}$, fra hastighedskonstanten for udskillelse k_2), assimileringseffektiviteten (absorption i tarmene, a), den kinetiske fødebiomagnificeringsfaktor (BMFK), den vækstkorregerede kinetiske biomagnificeringsfaktor i føde (BMFK_g) og den lipidkorregerede ⁽²⁾ kinetiske biomagnificeringsfaktor i føde (BMFK_L) (og/eller den vækst- og lipidkorregerede kinetiske fødebiomagnificeringsfaktor (BMFK_{gL}) for teststoffet i fisk. Med hensyn til metoden med eksponering i vand vil stigningen i fiskemasse i løbet af testen medføre en fortynding af teststoffet i voksende fisk, og dermed bliver (kinetisk) BCF undervurderet, hvis der ikke korrigeres for vækst (jf. punkt 162 og 163). Hvis det skønnes, at ligevægt er indtrådt i optagelsesfasen, kan man beregne en vejledende ligevægts-BMF. Der findes metoder, som gør det muligt at anslå en kinetisk biokoncentreringsfaktor (BCF_k) fra data, der er genereret i fodringsundersøgelsen (f.eks. (44) (45) (46) (47) (48). Fordele og ulemper ved sådanne metoder er beskrevet i tillæg 8.

Testen er primært tilrettelagt med henblik på tungtopløselige ikke-polære organiske stoffer, der i det store og hele følger optagelses- og udskillelseskinetik af første orden i fisk. Hvis et stof testes og ikke i alt væsentligt følger optagelses- og udskillelseskinetik af første orden, bør der tages mere komplekse modeller i brug (se henvisningerne i tillæg 5) og søges bistand fra en biostatistiker eller farmakokinetiker.

⁽¹⁾ For de fleste teststoffer bør der ideelt set ikke konstateres teststofkoncentrationer i kontrolvandet. Baggrundskoncentrationer bør kun være relevante for naturligt forekommende materialer (f.eks. visse metaller) og stoffer, der findes overalt i miljøet.

⁽²⁾ Da BMF er defineret som forholdet mellem et stofs koncentration i en organisme og koncentrationen i organismens foder ved ligevægt, tages der hensyn til fedtstof ved at korrigere for fedtstofindholdet i organismen og foderet, hvorfor det beskrives mere præcist som en "korrektion". Denne tilgang adskiller sig fra "normalisering" til et fast fedtindhold i organismen, som det gøres i biokoncentrerings testen med eksponering i vand.

BMF bestemmes normalt ved hjælp af en teststofanalyse af hele fisk (vådvægt). Hvis det er relevant for undersøgelsens formål, kan der udtages prøver af specifikt væv (f.eks. muskler eller lever), hvis fiskene er inddelt i spiselige og ikke-spiselige dele (jf. punkt 21). Man kan desuden fjerne og efterfølgende særskilt analysere mave-tarm-kanalen for at bestemme bidraget til koncentrationer i hele fisk for prøveudtagninger ved optagelsesfasens afslutning og tæt ved udskillelsesfasens begyndelse eller som en del af en massebalancemetode.

Fedtindholdet i udtagne, hele fisk bør måles, således at koncentrationerne kan korrigeres for fedtindhold, idet der tages hensyn til fedtindholdet i både foderet og fiskene (jf. punkt 56 og 57 og bilag 7).

De prøveudtagne fisks vægt bør måles og registreres og knyttes til det analyserede stofs koncentration for den enkelte udtagne fisk (f.eks. rapporteret ved hjælp af en unik kode for hver fisk i stikprøven) med henblik på beregning af fiskenes vækst under testen. Fiskens samlede længde bør også måles, hvor det er muligt ⁽¹⁾. Vægtdata er også nødvendige for at anslå BCF; her anvendes udskillelsesdataene fra foderet.

OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

Oplysninger om teststoffet bør foreligge, jf. beskrivelse i punkt 3 og 22. En analytisk metode for koncentrationer af teststof i vand er normalt ikke nødvendig; der er behov for metoder med tilstrækkelig følsomhed til at måle koncentrationer i fiskefoder og fiskevæv.

Metoden kan anvendes til at teste mere end et stof i en enkelt test. Teststofferne bør dog være forenelige med hinanden, så de ikke interagerer eller ændrer deres kemiske identitet, efter at de er blevet tilsat fiskefoder. Sigtet er, at de målte resultater for hvert stof, der testes sammen, ikke bør afvige væsentligt fra de resultater, der ville være fremkommet, hvis der var foretaget individuelle test for hvert teststof. Det bør gennem indledende analytisk arbejde fastslås, at hvert stof kan genfindes i en prøve af foder spiked med flere teststoffer og af fiskevæv med i) høj genfinding (f.eks. > 85 % af de nominelle værdier) og ii) den følsomhed, der kræves til test. Den samlede dosis af testede stoffer bør ligge under den kombinerede koncentration, der kan forårsage toksiske virkninger (jf. punkt 51). Desuden bør der i tilrettelæggelsen af testen tages hensyn til eventuelle skadelige virkninger i fisk og potentialet for interaktive virkninger (f.eks. metaboliske virkninger) i forbindelse med samtidig test af flere stoffer. Samtidig test af ioniserbare stoffer bør undgås. I henseende til eksponering er metoden også velegnet til komplekse blandinger (jf. punkt 13, selv om der her gælder samme analysemæssige begrænsninger som for enhver anden metode).

TESTENS GYLDIGHED

Følgende betingelser skal være opfyldt, for at testen betragtes som gyldig (jf. punkt 24):

- Vandtemperaturudsvingene skal være under ± 2 °C i behandlings- eller kontrolgrupper.
- Koncentrationen af opløst ilt må ikke falde til under 60 % af luftens mætning.
- Koncentrationen af teststoffet i fiskefoder før og ved afslutningen af optagelsesfasen må højst afvige med ± 20 % (baseret på mindst tre prøver taget på begge tidspunkter).
- Der bør i indledende analyser af foder spiked med teststof påvises en høj grad af ensartethed af stoffet — mindst tre koncentrationer for det stof, der udtages ved testens start, må ikke afvige mere end ± 15 % fra gennemsnittet.

⁽¹⁾ Den samlede længde bør også registreres i løbet af testen, da den er en god indikator for, om der er opstået skadelige virkninger.

- Koncentrationer af teststoffet registreres ikke, eller er kun til stede i typiske spormængder, i foder uden teststof eller væv fra kontrolfisk vedrørende behandlede stikprøver.
- Dødelighed og andre skadevirkninger/sygdomme i både kontrol- og testgruppen bør være ≤ 10 % ved testens afslutning; forlænges testen af en eller anden grund, er skadevirkningerne i begge grupper ≤ 5 % pr. måned og ≤ 30 % kumulativt. Væsentlige forskelle i gennemsnitlig vækst mellem testen og kontrolgrupperne af udtagne fisk kan være et tegn på, at testkemikallet har en toksisk virkning.

REFERENCESTOFFER

Hvis et laboratorium ikke har udført assayet før, eller der er foretaget væsentlige ændringer (f.eks. ny fiskestamme eller leverandør, forskellige fiskearter, betydelige ændringer i fiskenes størrelse, fiskefoder eller spikingmetode), anbefales det at undersøge dets tekniske kompetence, idet der her anvendes et referencestof. Referencestoffet bruges primært til at fastslå, om spikingteknikken er tilstrækkelig til at sikre maksimal ensartethed og biotilgængelighed af teststoffer. Et stof, der er blevet anvendt i forbindelse med ikke-polære hydrofobe stoffer, er hexachlorbenzen (HCB), men andre stoffer, hvorom der findes pålidelige data om optagelses- og biomagnificering, bør tages i betragtning på grund af HCB's farlige egenskaber⁽¹⁾. Hvis der anvendes et referencestof, bør grundlæggende oplysninger herom medtages i testrapporten, herunder betegnelse, renhed, CAS-nummer, struktur, toksicitetsdata (hvis sådanne findes), på samme måde som for teststoffer (jf. punkt 3 og 22).

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

Materialer og apparater bør anvendes som beskrevet i metoden til eksponering i vand (jf. punkt 26). Der bør anvendes statiske udskiftnings- eller gennemstrømningssystemer, som giver en tilstrækkelig mængde fortyndingsvand i testtankene. Flowhastighederne bør registreres.

Vand

Testvand bør anvendes som beskrevet i metoden til eksponering i vand (jf. punkt 27-29). Testmediet bør karakteriseres som beskrevet, og dets kvalitet bør forblive konstant under testen. Det naturlige partikelindhold og det samlede indhold af organisk kulstof bør være så lavt som muligt (≤ 5 mg/l partikler, ≤ 2 mg/l total organisk kulstof) før testens start. TOC skal kun måles før testen som led i beskrivelsen af testvandet (jf. punkt 53).

Føde

Et kommercielt tilgængeligt fiskefoder (flydende og/eller langsomt synkende piller), der som minimum er karakteriseret i henseende til protein- og fedtindhold, anbefales. Foderet bør have en ensartet pillestørrelse for at øge effektiviteten af eksponeringen for foderet, dvs. at fiskene vil spise mere af foderet i stedet for at spise de større stykker og lade de mindre ligge. Pillernes størrelse bør være tilpasset fiskenes størrelse ved testens start (der kan f. eks. anvendes en diameter på ca. 0,6-0,85 mm for fisk med en samlet længde på mellem 3 og 7 cm og 0,85-1,2 mm for fisk med en samlet længde på mellem 6 og 12 cm). Pillestørrelsen kan tilpasses efter fiskenes vækst i starten af udskillelsesfasen. Et eksempel på en egnet fodersammensætning, som findes i handlen, kan ses i tillæg 7. Testfoder med et samlet fedtindhold på 15-20 % (vægt/vægt) er normalt blevet anvendt i udviklingen af denne metode. Fiskefoder med en så høj fedtkoncentration kan muligvis ikke fås i visse regioner. I så fald kan casestudierne gennemføres med foder med en lavere fedtkoncentration, og fodermængden kan om nødvendigt tilpasses for at opretholde fiskenes sundhedstilstand (baseret på indledende test). Det samlede fedtindhold i test- og kontrolgruppens føde skal måles og registreres inden testens start og ved optagelsesfasens afslutning. Oplysninger fra leverandøren af det kommercielle foder om analyser af næringsstoffer, vand, fibre og aske samt om muligt mineraler og pesticidrester (f.eks. prioriterede forurenende "standardstoffer") bør indgå i forsøgsrapporten.

⁽¹⁾ HCB er opført i bilag A og C til Stockholm-konventionen og i bilag I og III til forordning (EF) nr. 850/2004 om persistente organiske miljøgifte (EUT L 158 af 30.4.2004, s. 7).

Når foderet spikes med teststof, bør der gøres alt for at sikre, at testfoderet er ensartet. Koncentrationen af teststof i testgruppens foder bør vælges ud fra analyseteknikkens følsomhed, teststoffets toksicitet (nul-effekt-koncentrationsdata, NOEC, hvis disse foreligger) og relevante fysisk-kemiske data. Hvis der anvendes referencestof, anbefales det at tilsætte det ved en koncentration på ca. 10 % af teststoffets (eller i hvert fald så lav koncentration som muligt), med forbehold af analysefølsomhed (f.eks. er en koncentration i foderet på 1-100 µg/g blevet accepteret for hexachlorbenzen, jf. (47) for yderligere oplysninger om HCB's assimileringseffektivitet).

Teststoffet kan spikes til fiskefoderet på flere måder afhængigt af dets fysiske egenskaber og opløselighed (jf. tillæg 7 for yderligere oplysninger om tilsætningsmetoder):

- Hvis stoffet er opløseligt og stabilt i triglycerider, bør det opløses i en lille mængde fiskeolie eller vegetabilsk spiseolie, inden det blandes i fiskefoderet. I dette tilfælde bør det undgås at lave en ration med højt fedtindhold, idet der skal tages hensyn til det naturlige fedtindhold i det foder, der spikes med teststof. Der tilsættes derfor den minimale, kendte mængde olie, som er nødvendig for at fordele teststoffet og sikre homogenitet i foderet.
- Foderet bør spikes med et egnet organisk opløsningsmiddel, så længe dette ikke udgør en risiko for homogenitet og biotilgængelighed (der kan muligvis dannes (mikro)krystaller af prøvestoffet i foderet som følge af fordampning af opløsningsmidlet, og der findes ikke nogen let måde at påvise, at dette ikke har fundet sted, jf. (49)).
- Ikke-viskøse væsker tilsættes direkte til fiskefoder, men de bør være godt opblandede for at fremme homogenitet og god assimilering. Blandingsteknikken bør sikre homogenitet i det spikede foder.

I nogle få tilfælde, f.eks. med mindre hydrofobe stoffer, der er mere tilbøjelige til at desorbere fra foderet, kan det være nødvendigt at hælde en smule majs-/fiskeolie på foderpillerne (jf. punkt 142). I sådanne tilfælde bør kontrolfoderet behandles på samme måde og den færdige foderblanding bruges til måling af fedtindhold.

Hvis resultaterne af referencestoffet anvendes, bør de være sammenlignelige med data fra undersøgelser gennemført under samme forhold og med en sammenlignelig fodermængde (jf. punkt 45), og stofspecifikke referenceparametre bør opfylde de relevante kriterier i punkt 113 (3., 4. og 5. punkt).

Hvis et olie- eller bærestofopløsningsmiddel anvendes som bærestof for teststoffet, bør en tilsvarende mængde af samme bærestof (uden teststof) iblandes kontrolfoderet for at sikre, at det fortsat svarer til det spikede foder. Det er vigtigt, at test- og kontrolgrupperne får foder med samme næringsværdi under både optagelses- og udskillelsesfasen.

Det spikede foder bør opbevares under sådanne forhold, at teststoffets stabilitet i foderblandingen bevares (f.eks. på køl), og disse betingelser bør rapporteres.

Valg af fiskeart

Fiskearter specificeret for eksponering i vand kan anvendes (jf. punkt 32 og tillæg 3). Regnbueørred (*Oncorhynchus mykiss*), karpe (*Cyprinus carpio*) og tykhovedet elritse (*Pimephales promelas*) har været almindeligt anvendt i undersøgelser om bioakkumulering med organiske stoffer før offentliggørelsen af denne TM. Den valgte testart bør have en fodringsadfærd, der resulterer i hurtigt indtag af den indgivne foderration, for at sikre, at alle faktorer, der påvirker koncentrationen af teststoffet i foder (f.eks. udvaskning i vandet og muligheden af eksponering i vand) holdes på et minimum. Der bør anvendes fisk af den anbefalede størrelse/vægt (jf. tillæg 3). Fiskene bør ikke være så små, at de vanskeliggør analyser baseret på den enkelte fisk. Arter, der testes i fuld livscyklus med hurtig vækst, kan komplicere fortolkningen af data, og høje vækstrater kan påvirke beregningen af assimileringseffektiviteten (¹).

(¹) Hvis væksten sker hurtigt i løbet af optagelsesfasen, vil den reelle fodring falde til under det, der er fastsat ved eksponeringens begyndelse.

Opbevaring af fiskene

Acceptkriterierne for akklimatisering, dødelighed og sygdom er de samme som for metoden med eksponering i vand forud for testens gennemførelse (jf. punkt 33-35).

TESTENS UDFØRELSE

Forundersøgelse og prøve til bestemmelse af dosisinterval

Analytiske forundersøgelser er nødvendige for at påvise genfindning af stoffet i spiked foder/fiskevæv. Det er ikke altid nødvendigt at foretage en forprøve for at vælge en passende koncentration i foderet. Som dokumentation for at der ikke er observeret skadelige virkninger, og for at evaluere det spikede foders smag, analysemetodens følsomhed i forhold til fiskevæv og foder samt valg af egnet fodrings- og prøveudtagningsplan under udskillelsesfasen osv., kan der foretages indledende fodringsforsøg, men det er ikke obligatorisk. En forundersøgelse kan være en god idé til at anslå, hvor mange fisk der skal udtages til prøve i udskillelsesfasen. Dette kan resultere i en betydelig reduktion i antallet af anvendte fisk, især for teststoffer, der er særligt følsomme over for metabolisme.

Eksponeringsbetingelser

Optagelsesfasens længde

En optagelsesfase på 7-14 dage er normalt tilstrækkeligt. Her fodres en gruppe fisk med kontrolfoder, en anden gruppe fisk får testfoderet dagligt i faste rationer afhængigt af den testede art og forsøgsbetingelserne, f.eks. mellem 1-2 % af kropsvægten (vådvægt) for regnbueørred. Fodermængden bør fastsættes på en sådan måde, at hurtig vækst og stor stigning i fedtindholdet undgås. Optagelsesfasen kan efter behov forlænges på baggrund af praktiske erfaringer fra tidligere undersøgelser eller viden om teststoffets (eller dertil svarende) optagelse og udskillelse i fisk. Testens begyndelse defineres som den første fodring med spiked foder. En testdag starter på det tidspunkt, hvor fiskene fodres, og slutter kort før næste fodring (f.eks. en time). Den første testdag i optagelsesfasen starter ved den første fodring med spiked foder og slutter kort før den anden fodring med spiked foder. I praksis slutter optagelsesfasen kort før (f.eks. en time) første fodring med rent foder, da fiskene vil fortsætte med at fordøje foderet med teststof og absorbere teststoffet i de mellemliggende 24 timer. Det er vigtigt at sikre, at der opnås en tilstrækkelig høj (ikke-giftig) belastning af kroppen fra teststoffet med hensyn til den analytiske metode, således at der kan måles en nedgang i størrelsesorden i udskillelsesfasen. I særlige tilfælde kan der bruges forlængede optagelsesfaser (op til 28 dage) med yderligere prøveudtagning for at opnå viden om optagelseskinetik. Koncentrationen i fiskene når ikke nødvendigvis ligevægt i optagelsesfasen. Ligninger til at beregne tiden indtil ligevægt som en indikation af det tidsrum, der er nødvendigt for at nå op på tydelige koncentrationer i fisk, kan anvendes her som ved testen med eksponering i vand (jf. tillæg 5).

I nogle tilfælde er 7-14 dage til optagelse af stof i fisk ikke tilstrækkelig lang tid til, at den anvendte foderkoncentration når op på en koncentration, der er tilstrækkeligt høj til, at det er muligt at analysere mindst en nedgang i størrelsesorden i udskillelsesfasen, enten på grund af dårlig analytisk følsomhed eller lav assimileringseffektivitet. I sådanne tilfælde kan det være en fordel at forlænge den oprindelige fodringsfase til over 14 dage, eller man bør for især meget omsættelige stoffer overveje en højere koncentration. Det bør dog sikres, at den samlede belastning i optagelsesfasen holdes under den (skønnede) kroniske NOEC-værdi i fiskevæv (punkt 138).

Udskillelsesfasens længde

Udskillelsen varer typisk i op til 28 dage fra det tidspunkt, hvor den første testgruppe fodres med rent, ubehandlet foder efter optagelsesfasen. Udskillelsen starter ved den første fodring med ikke-spiked foder og ikke lige efter den seneste fodring med spiked foder, da fisken vil fortsætte med at fordøje foderet og absorbere teststoffet i de mellemliggende 24 timer som anført i punkt 126. Derfor tages den første prøve i udskillelsesfasen kort tid før den anden fodring med foder uden teststof. I denne udskillelisesperiode opfanges stoffer med en potentiel halveringstid på op til 14 dage, hvilket er i overensstemmelse med halveringstiden for bioakkumulerende stoffer ⁽¹⁾ — 28 dage omfatter altså to halveringstider for disse stoffer. I tilfælde af meget stærkt bioakkumulerende stoffer kan det være en fordel at forlænge udskillelsesfasen (hvis dette er indikeret fra forprøven).

Selv om et stof udskilles meget langsomt, således at det ikke er muligt at bestemme en nøjagtig halveringstid i udskillelsesfasen, kan oplysningerne dog stadig være tilstrækkelige til at indikere et bioakkumuleringsniveau. Hvis et stof omvendt udskilles så hurtigt, at der ikke kan udledes en pålidelig nulstillingskoncentration (koncentration ved slutningen af optagelsen/starten af udskillelsen, CO_0), og k_2 ikke kan beregnes, kan der foretages et konservativt skøn over k_2 (jf. tillæg 7).

Hvis analyserne af fisk ved tidligere intervaller (f.eks. 7 eller 14 dage) viser, at stoffet er udskilt under kvantificeringsniveauer inden de fulde 28 dage, vil efterfølgende prøveudtagninger blive indstillet og testen afsluttet.

I nogle få tilfælde er der måske ingen målbar optagelse af teststoffet ved optagelsesperiodens slutning (eller med den anden udskillelsesprøve). Hvis det kan påvises, at: i) validitetskriterierne i punkt 113 er opfyldt, og ii) den manglende anvendelse ikke skyldes andre mangler ved testen (f.eks. at optagelsesfasen ikke har været lang nok, mangler ved spiking-teknikken, som fører til lav biotilgængelighed, ikke tilstrækkeligt følsom analysemetode, at fiskene ikke indtager foder osv.), kan undersøgelsen afsluttes, uden at det er nødvendigt at gennemføre den på ny med en længere optagelsesfase. Hvis forundersøgelsen har vist, at dette kan være tilfældet, anbefales det om muligt at analysere fækal materiale for ufordøjet teststof som led i en massebalancetilgang.

Antal testfisk

Lige som ved testen med eksponering for teststof i vand bør der vælges fisk af samme vægt og længde, og de mindste fisk må ikke veje mindre end to tredjedele af de største fisks vægt (jf. punkt 40-42).

Det samlede antal fisk i undersøgelsen bør fastlægges på grundlag af prøveudtagningsplanen (mindst en prøve ved afslutningen af optagelsesfasen og fire til seks prøver under udskillelsesfasen, men afhængigt af fasernes varighed), idet der tages hensyn til analyseteknikkens følsomhed, den koncentration, der sandsynligvis vil blive opnået ved optagelsesfasens afslutning (baseret på allerede eksisterende viden) og udskillelisesperiodens varighed (hvis allerede eksisterende viden muliggør skøn). Fem-ti fisk bør udtages hver gang, og vækstparametrene (vægt og længde i alt) måles, før der foretages en analyse af kemikalie eller fedtstof.

På grund af den iboende variation i fiskenes størrelse, vækst og fysiologi og de sandsynlige udsving i den mængde foder, som hver fisk indtager, bør mindst fem fisk udtages ved hvert interval fra testgruppen og fem fra kontrolgruppen for at kunne beregne den gennemsnitlige koncentration og dens variation tilstrækkelig sikkert. Variationen blandt de anvendte fisk kan forventes at bidrage mere til den samlede utilsigtede variation i testen end variationen i de anvendte analytiske metoder, hvilket i nogle tilfælde dermed retfærdiggør brugen af op til ti fisk pr. prøveudtagningspunkt. Hvis det ikke er muligt at måle baggrundskoncentrationer for teststoffet i kontrolfisk ved begyndelsen af udskillelsesfasen, kan det være tilstrækkeligt at foretage en kemisk analyse af to-tre kontrolfisk ved det sidste prøveudtagningsinterval, så længe de resterende kontrolfisk ved alle prøveudtagningspunkter stadig udtages med henblik på måling af vægt og samlet længde (således at der udtages det samme antal prøver fra test- og kontrolgruppen med henblik på måling af vækst). Fisk bør opbevares, vejes enkeltvis (også selv om det viser sig at være nødvendigt efterfølgende at kombinere prøveresultaterne), og den samlede længde måles.

⁽¹⁾ I en undersøgelse af eksponering i vand vil en halveringstid på 14 dage svare til en BCF på ca. 10 000 L/kg, hvor der anvendes fisk på 1 g med en tilsvarende optagelse på ca. 500 L/kg/dag (ifølge formel udarbejdet af Sijm *et al.* (46)).

Til en standardtest med en udskillelsesfase på f.eks. 28 dage inklusive to udskillelsesprøver betyder dette i alt 59-120 fisk fra testgruppen og 50-110 fisk fra kontrolgruppen, idet det forudsættes, at den analyseteknik, der anvendes til stoffet, gør det muligt at foretage en analyse af fedtindholdet i samme fisk. Hvis der ikke kan foretages en analyse af fedtindhold og indhold af teststof i samme fisk, og det heller ikke er muligt udelukkende at bruge kontrollfisk til at analysere fedtindhold (jf. punkt 56), skal der anvendes yderligere 15 fisk (tre fra stampopulationen ved testens start, tre hver fra kontrol- og testgruppen ved begyndelsen af udskillelsesfasen og tre fra kontrol- og testgruppen ved forsøgets slutning). Et eksempel på en prøveudtagningsplan med antal fisk kan findes i tillæg 4.

Belastning

Der bør anvendes samme vand-fisk-forhold som i metoden med eksponering for teststof i vand (jf. punkt 43 og 44). Selv om fisk-til-vand-belastningsgraden ikke påvirker eksponeringskoncentrationen i denne test, anbefales en belastning på 0,1-1,0 g fisk (vådvægt) pr. liter vand pr. dag for at opretholde passende koncentrationer af opløst ilt og mindske stressbelastningen for testorganismerne.

Testføde og fodring

Under akklimatiseringsperioden bør fiskene fodres med passende foder som beskrevet ovenfor (punkt 117). Hvis testen gennemføres med et gennemstrømningssystem, skal dette standses, mens fiskene fodres.

Under testen skal testgruppen have det ovenfor beskrevne foder (punkt 116-121). Ud over at overveje stofs specifikke faktorer, analytisk følsomhed, forventet koncentration i foderet under miljøforhold og kroniske toksicitetsniveauer/belastning af kroppen, bør der ved valg af spiking-koncentration tages hensyn til foderets smagskvalitet (så fiskene ikke lader være med at spise). Den nominelle spiking-koncentration bør dokumenteres i rapporten. Erfaringen viser, at spiking-koncentrationer i størrelsesordenen 1-1 000 1-1 000 1-1 000 µg/g er et praktisk interval for teststoffer, der ikke udviser en specifik toksisk mekanisme. For stoffer, der fungerer i en ikke-specifik mekanisme, bør restmængden i væv ikke overstige 5 µmol/g fedt, da der er sandsynlighed for, at restkoncentrationer over dette niveau skaber kroniske virkninger (19) (48) (50) ⁽¹⁾. For andre stoffer bør det sikres, at der ikke indtræffer skadelige virkninger på grund af den akkumulerede eksponering (jf. punkt 127). Dette gælder navnlig, hvis der testes mere end et stof samtidig (jf. punkt 112).

Fiskefoderet kan spikes med en passende mængde teststof på en af tre måder, jf. beskrivelsen i punkt 119 og tillæg 7. Spiking-metoderne og -procedurerne bør dokumenteres i rapporten. Kontrollfiskene får uforarbejdet foder med en tilsvarende mængde ikke-spiked oliebestanddel, hvis et sådant er brugt i det spiked foder i optagelsesfasen, eller de får foder, der er behandlet med "rent" opløsningsmiddel, hvis der er anvendt opløsningsmiddel/bærestof i testgruppens foder. Det behandlede og ubehandlede foder bør som minimum måles analytisk tre gange for at bestemme teststofkoncentrationen før optagelsesfasens begyndelse og afslutning. Efter eksponering for det behandlede foder (optagelsesfase) fodres fiskene (begge grupper) med ubehandlet foder (udskillelsesfase).

Fiskene får en fast ration (afhængigt af art, f.eks. ca. 1-2 % af fiskenes vådvægt pr. dag for regnbueørred). Fodermængden bør fastsættes på en sådan måde, at hurtig vækst og stor stigning i fedtindholdet undgås. Den fodermængde, der er fastsat for hele forsøget, bør registreres. Det foder, der gives i starten, bør baseres på vægtmålinger af stampopulationen umiddelbart forud for testens start. Fodermængden bør tilpasses på grundlag af de udtagne fisks vådvægt ved hver prøveudtagning, således at der kan tages hensyn til vækst under forsøget. Test- og kontrollfiskenes vægt og længde kan anslås ud fra vægt og samlet længde af de fisk, der bruges ved hver prøveudtagning. De fisk, der er tilbage i test- og kontrolltankene, skal ikke måles og vejes. Det er vigtigt at bevare samme fodermængde gennem hele forsøget.

⁽¹⁾ Da de faktiske indre koncentrationer først kan fastslås efter testen, er der behov for et skøn over den forventede indre koncentration (f. eks. baseret på den forventede BMF og koncentrationen i foderet, jf. ligning A5.8 i tillæg 5).

Fodringen bør observeres for at sikre, at fiskene rent faktisk indtager alt foderet, således at det er de rigtige tal for indtagelse, der bruges i beregningerne. Indledende fodringsforsøg eller tidligere erfaringer bør indgå i overvejelserne ved valg af fodermængde, således at det sikres, at alt foder fra den daglige fodring indtages. Hvis foderet konsekvent ikke spises op, kan det anbefales at sprede fodringen (f.eks. fordele samme fodermængde over to fodringer dagligt i stedet for en). Hvis dette er nødvendigt, bør den anden fodring ske på samme tid hver dag, og således at der går mest mulig tid før den første udtagning af fiskeprøver (f.eks. så den anden fodring også finder sted i løbet af første halvdel af en forsøgsdag).

Skønt fisk normalt er hurtige til at indtage foderet, er det vigtigt at sikre, at stoffet forbliver adsorberet til foderet. Det bør undgås, at teststoffet spredes i vandet fra foderet, da fiskene i så fald eksponeres for koncentrationer af teststoffet i vandet ud over eksponeringen i foderet. Dette kan opnås ved at fjerne foderrester (og faeces) fra test- og kontroltankene senest en time, men helst kun en halv time efter fodring. Desuden kan man anvende et system, hvor vandet løbende renses gennem et filter med aktivt kul for at absorbere eventuelle "opløste" forurenende stoffer. Gennemstrømningssystemer kan hurtigt fjerne foderpartikler og opløste stoffer⁽¹⁾. En mindre ændring af teknikken for spiking af foderet kan bidrage til at mindske dette problem (jf. punkt 119).

Lys og temperatur

Som med eksponering i vand (jf. punkt 48) anbefales en lysperiode på 12-16 timer og en temperatur på ± 2 °C til den fiskeart, der bruges i testen (jf. tillæg 3). Belysningens type og karakteristika bør være kendt.

Kontroller

Der bør bruges en kontrolgruppe, hvor fiskene fodres med samme ration som testgruppen, men uden teststof i foderet. Hvis der som bærestof bruges olie eller opløsningsmiddel til at spike foderet i testgruppen, bør kontrolgruppens foder behandles på nøjagtig samme måde, men ikke tilsættes teststof, således at test- og kontrolgruppen ellers får samme foder (jf. punkt 121 og 139).

Hyppighed af målinger af vandkvaliteten

De betingelser, der er beskrevet for metoden med eksponering i vand, gælder også her, bortset fra at TOC kun skal måles før prøven som en del af beskrivelsen af testvandet (jf. punkt 53).

Prøveudtagning og analyse af fisk og føde

Analyse af foderprøver

Prøver af test- og kontrolfoderet bør analyseres mindst tre gange for teststof og fedtindhold og mindst før begyndelsen og afslutningen af optagelsesfasen. Analysemetoderne og procedurerne til sikring af fødens homogenitet bør beskrives i rapporten.

⁽¹⁾ Det er måske ikke muligt fuldstændig at undgå tilstedeværelsen af teststof i testmediet som følge af fiskenes udskillelse eller udvaskning fra foderet. En mulighed er derfor at måle stoffekonzentrationen i vand ved afslutningen af udskillelsesfasen, især hvis der anvendes en semistatistisk metode, for at afdække eventuel eksponering i vand.

Prøverne bør analyseres for teststof ved hjælp af en kendt, valideret metode. Der bør gennemføres forundersøgelser for at bestemme kvantificeringsgrænsen, den procentvise genfinding, interferens og analytisk varians i den ønskede prøvematrix. Hvis der testes radioaktivt mærket stof, anbefales det at gøre de samme overvejelser som ved metoden med eksponering i vand, idet analysen af vand her erstattes af en analyse af foder (jf. punkt 65).

Analyse af fisk

Ved hver udtagning af fiskeprøver udtages 5-10 fisk fra eksponerings- og kontrolbehandlinger (i nogle tilfælde kan antallet af kontrolfisk reduceres, jf. punkt 134).

Prøver bør udtages på samme tid hver forsøgsdag (i forhold til fodringstid) og bør ske på et tidspunkt, hvor sandsynligheden for, at der stadig er foder i tarmen under optagelsesfasen og begyndelsen af udskillelsesfasen, mindskes for at forebygge fordrejende bidrag til de samlede stofkoncentrationer (dvs. at udtagne fisk bør fjernes ved forsøgsdagens slutning, idet der gøres opmærksom på, at en forsøgsdag starter på fodringstidspunktet og slutter ved næste fodring, dvs. ca. 24 timer senere. Udskillelsesfasen begynder, første gang der fodres med ikke-spiked foder, jf. punkt 128). Den første prøve fra udskillelsesfasen (der udtages kort før anden fodring med ikke-spiked foder) er vigtig, da ekstrapolering tilbage en dag fra denne måling bruges til at anslå nulstillingskoncentrationen ($C_{0,d}$, koncentrationen i fiskene ved optagelsesfasens afslutning/udskillelsesfasens begyndelse). Alternativt kan fiskens mave-tarm-system fjernes og analyseres separat ved slutningen af optagelsesfasen og på dag 1 og 3 i udskillelsesfasen.

Ved hver prøveudtagning bør fiskene fjernes fra de to testbeholdere og behandles som beskrevet under metoden med eksponering i vand (jf. punkt 61-63).

Koncentrationer af teststof i hele fisk (vådvægt) måles mindst ved udgangen af optagelsesfasen og under udskillelsesfasen i både kontrol- og testgruppe. Under udskillelsesfasen anbefales 4-6 prøveudtagningspunkter (f.eks. efter 1, 3, 7, 14 og 28 dage). Alternativt kan der medtages yderligere et prøveudtagningspunkt efter 1-3 dages optagelse for at anslå assimileringseffektiviteten fra den lineære optagelsesfase for fisken, men stadig tæt ved eksponeringsfasens begyndelse. Der findes to primære afvigelser fra planen: i) hvis optagelsesfasen forlænges med det formål at undersøge optagelseskinetik, kommer optagelsesfasen til at omfatte yderligere prøveudtagningspunkter, hvorfor der er behov for flere fisk (jf. punkt 126), ii) hvis undersøgelsen afsluttes ved udgangen af optagelsesfasen, fordi det ikke har været muligt at måle optagelsen (jf. punkt 131). De enkelte udtagne fisk bør vejes (og deres længde i alt måles) med henblik på at bestemme væksthastighedskonstanter. Koncentrationer af teststof i bestemt fiskevæv (spiselige og ikke-spiselige dele) kan også måles ved optagelsesfasens slutning og på udvalgte tidspunkter under udskillelsesfasen. Hvis der testes radioaktivt mærket stof, anbefales det at gøre de samme overvejelser som ved metoden med eksponering i vand, idet analysen af vand her erstattes af en analyse af foder (jf. punkt 65).

Med hensyn til periodisk anvendelse af referencestof (jf. punkt 25) anbefales det, at koncentrationerne måles i testgruppen ved optagelsesfasens slutning og på alle de tidspunkter under udskillelsesfasen, der er specificeret for teststoffet (hele fisk). Koncentrationerne behøver kun at blive analyseret i kontrolgruppen ved optagelsesfasens slutning (hele fisk). Under visse omstændigheder (f.eks. hvis analyseteknikkerne for teststof og referencestof er uforenelige, således at der er behov for flere fisk for at følge prøveudtagningsplanen) kan en anden tilgang vælges for at mindske behovet for yderligere fisk. Koncentrationer af referencestoffet måles kun på dag 1 og 3 og på to andre prøveudtagningspunkter under udskillelsesfasen, som skal ligge på tidspunkter, der gør det muligt at foretage pålidelige skøn over nulstillingskoncentration ($C_{0,d}$) og k_2 for referencestoffet.

Hvis det er muligt, bør den enkelte fisks fedtindhold bestemmes ved hver prøveudtagning eller som minimum ved optagelsesfasens start og afslutning og udskillelsesfasens afslutning (jf. punkt 56 og 67). Afhængigt af analysemetode (jf. punkt 67 og tillæg 4) kan det være muligt at anvende samme fisk til bestemmelse af både fedtindhold og teststofkoncentration. Dette anbefales af hensyn til ønsket om at reducere antallet af anvendte fisk. Hvis dette ikke er muligt, kan samme tilgang som beskrevet under metoden med eksponering i vand bruges (jf. punkt 56 for disse alternative muligheder for måling af fedtindhold). Den metode, der anvendes til at kvantificere fedtindholdet, bør dokumenteres i rapporten.

Analysemetodens egnethed

Der bør foretages kontroller af forsøget for at sikre den stofspecifikke analysetekniks specificitet og reproducerbarhed samt genfindinger af teststof fra både foder og fisk.

Måling af fiskenes vækst

Ved teststarten skal udtagne fisk fra stampopulationen vejes (og deres samlede længde måles). Disse fisk bør udtages kort før første fodring med spiked foder (f.eks. en time) og hensættes til forsøgsdag 0. Der bør i denne prøveudtagning udtages samme antal fisk som ved udtagninger under testen. Nogle af disse fisk kan anvendes til at analysere fedtindhold før optagelsesfasens start (jf. punkt 153). Ved hver prøveudtagning vejes fiskene, og deres længde måles. For hver enkelt fisk bør den målte vægt og længde sættes i forhold til den analyserede kemiske koncentration (og fedtindhold, hvis det er relevant), f.eks. ved hjælp af en entydig identifikatorkode for hver udtagne fisk. Målingerne af de udtagne fisk kan anvendes til at anslå vægten (og længden) af fisk, der bliver tilbage i test- og kontroltanke.

Evaluerings af forsøget

Dødelighed bør observeres og registreres dagligt. Yderligere observationer for skadelige virkninger bør foretages, f.eks. for unormal adfærd eller pigmentering, og disse bør registreres. Fisk anses for at være døde, hvis der ikke er åndedrætsbevægelser, og der ikke er reaktion på let mekanisk stimulus. Døde eller tydeligt moribunde fisk bør fjernes.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

Testresultater bruges til at udlede udskilleleshastighedskonstanten (k_2) som en funktion af fiskenes samlede vådvægt. Væksthastighedskonstanten, k_g , baseret på fiskenes gennemsnitlige vægtforøgelse, beregnes og anvendes til at udlede den vækstkorrigerede udskilleleshastighedskonstant k_{2g} , hvis dette er relevant. Assimilerings effektiviteten (a , absorption fra tarmen), den kinetiske biomagnetificeringsfaktor (BMF_k) (om nødvendigt vækstkorrigeret, BMF_{kg}), den lipidkorrigerede værdi (BMF_{KL} eller BMF_{KGL} , hvis der er korrigeret for vækstfortynding) og fodringsmængde bør rapporteres. Hvis der kan foretages et skøn over den tid, det tager at opnå ligevægt i optagelsesfasen (f.eks. 95 % af ligevægt eller $t_{95} = 3,0 / k_2$), kan der medtages et skøn over ligevægts-BMF (BMF_{ss}) (jf. punkt 105 og 106 og tillæg 5), hvis værdien T_{95} angiver, at betingelserne for ligevægt kan være opfyldt. Der bør anvendes samme korrigerings for fedtindhold på denne BMF_{ss} som på den kinetisk beregnede BMF (BMF_k) for at få en lipidkorrigeret værdi, BMF_{SSL} (det bemærkes, at der ikke findes en vedtagen procedure til at korrigere et ligevægts-BMF for vækstfortynding). Formler og eksempler på beregninger findes i tillæg 7. Der findes metoder, som gør det muligt at anslå en kinetisk biokoncentreringsfaktor (BCF_k) fra data fra foderundersøgelsen. Dette diskuteres i tillæg 8.

Data om fisks vægt/længde

De enkelte fisks vægt og længde for alle tidsperioder indføres i tabeller for hver test- og kontrolgruppe for alle prøveudtagningsdage i optagelsesfasen (stampopulation for begyndelsen af optagelsesfasen, kontrolgruppe og testgruppe for slutningen af optagelsesfasen og den tidlige fase, hvis en sådan findes (f.eks. dag 1-3 i optagelsesfasen) og udskillelsesfasen (f.eks. dag 1, 2, 4, 7, 14 og 28 for kontrol- og testgruppe)). Vægt er den foretrukne måde at måle vækst på af hensyn til korrigerings for vækstfortynding. Se nedenfor (punkt 162 og 163) og tillæg 5 for de metoder, der anvendes til at korrigere data for vækstfortynding.

Data vedrørende teststofkoncentration i fisk

Målinger af rester af teststof i de enkelte fisk (eller poolede fiskeprøver, hvis det ikke er muligt at foretage målingerne i de enkelte fisk), udtrykt i vådvægtskoncentration (vægt/vægt) indføres i tabeller for test- og kontrolfisk for de enkelte prøveudtagningstidspunkter. Hvis fedtindholdet er analyseret for hver udtagen fisk, kan de individuelle fedtkorrigerede koncentrationer udtrykt i lipidkoncentration (vægt/vægt lipid) beregnes og opstilles i tabelform.

- Målinger af rester af teststof i de enkelte fisk (eller poolede fiskeprøver, hvis det ikke er muligt at foretage målingerne i de enkelte fisk, jf. punkt 66) for udskillelsesperioden konverteres til deres naturlige logaritmer og plottes i forhold til tid (dag). Hvis en visuel undersøgelse af kurven viser tydeligt ekstreme værdier, kan der anvendes en statistisk gyldig test for ekstreme værdier for at fjerne falske datapunkter, ledsaget af en dokumenteret begrundelse for, at de udelades.
- En lineær mindste kvadraters korrelation beregnes for data for $\ln$ (koncentration) i forhold til udskillelse (dag). Linjernes skæringspunkt og hældning rapporteres som den samlede udskillelseshastighedskonstant (k_2) og den naturlige logaritme af den afledte nulstillingskoncentration ($C_{0,d}$) (se tillæg 5 og 7 for yderligere oplysninger). Hvis dette ikke er muligt, fordi koncentrationerne falder til under kvantificeringsgrænsen for den anden udskillelsesprøve, kan der anlægges et konservativt skøn for k_2 (jf. tillæg 7).
- Varianserne i kurvens hældning og skæringspunkt beregnes under anvendelse af statistiske procedurer, og konfidensintervaller på 90 % (eller 95 %) omkring disse resultater evalueres og fremlægges.
- Den gennemsnitlige målte koncentration i fisk for den sidste optagelsesdag (målt nulstillingskoncentration, CO_m) beregnes også og sammenholdes med den afledte værdi $CO_{0,d}$. Hvis den afledte værdi er lavere end den målte værdi, kan forskellen indikere tilstedeværelse af ufordøjet, spiket foder i tarmen. Hvis den afledte værdi er meget højere end den målte værdi, kan dette være en indikation af, at den værdi, der er afledt af data fra den lineære regression for udskillelsen, er forkert og bør revurderes (jf. tillæg 7).

Udskillelseshastighedskonstant og biomagnificeringsfaktor

For at beregne biomagnificeringsfaktoren fra dataene bør assimileringseffektiviteten (absorption af teststof i tarmene, α) først beregnes. Hertil bør man benytte ligning A7.1 i tillæg 7, hvor den udledte koncentration i fisk ved udskillelsesfasens nulstilling ($C_{0,d}$), (samlet) udskillelseshastighedskonstant (k_2), koncentration i foder (C_{food}), hastighedskonstant for fødeoptagelse (I) og varighed af optagelsesperioden (t) skal være kendte. Hældning og skæringspunkt i den lineære forbindelse mellem $\ln$ (koncentration) og udskillelsetid rapporteres som den overordnede hastighedskonstant for udskillelse (k_2 = hældning) og nulstillingskoncentration ($C_{0,d} = e^{\text{intercept}}$), som ovenfor. De afledte værdier bør kontrolleres for biologisk sandsynlighed (f.eks. assimileringseffektivitet som en fraktion, der ikke er større end 1). (I) beregnes ved at dividere massen af foder med massen af fisk, der fodres hver dag (hvis de fodres med 2 % af kropsvægten, vil (I) være 0,02). Men det kan blive nødvendigt at tilpasse den fodermængde, der er anvendt ved beregningen, til fiskenes vækst (dette kan gøres ved at benytte den kendte væksthastighedskonstant til at anslå fiskenes vægt på hvert tidspunkt under optagelsesfasen, jf. tillæg 7). I tilfælde, hvor k_2 og $C_{0,d}$ ikke kan beregnes, f.eks. fordi koncentrationer faldt til under detektionsgrænsen for den anden udskillelsesprøve, kan der anlægges et konservativt skøn over k_2 og en "øvre" BMF_k (jf. tillæg 7).

Når assimileringseffektiviteten (α) er opnået, kan bioakkumuleringsfaktoren beregnes ved at gange α med indtagelseshastighedskonstanten (I) og dividere med den (samlede) udskillelseshastighedskonstant (k_2). Den vækstkorregerede biomagnificeringsfaktor beregnes derefter på samme måde, men her ved at anvende den vækstkorregerede udskillelseshastighedskonstant, jf. punkt 162 og 163. Et alternativt skøn over assimileringseffektiviteten kan anlægges, hvis der er foretaget en vævsanalyse på fisk, der er udtaget i den tidlige, lineære fase af optagelsesfasen, jf. punkt 151 og tillæg 7. Denne værdi repræsenterer et uafhængigt skøn over assimileringseffektiviteten for en i det væsentlige ikke eksponeret organisme (dvs. at fiskene er tæt ved optagelsesfasens begyndelse). Assimileringseffektiviteten som anslået ud fra udskillelsesdataene benyttes sædvanligvis til at udlede BMF .

Korrigeret for fedtindhold og vækstfortynding

Fiskenes vækst i udskillelsesfasen kan sænke målte kemikaliekoncentrationer i fiskene, hvilket betyder, at den samlede udskillelseskonstant, k_2 , er større, end den ville have været ved rene fjernelsesprocesser (f.eks. stofskifte eller egestion) (jf. punkt 72). Fedtindhold i testfisk (som hænger tæt sammen med bioakkumuleringen af hydrofobe stoffer) og fedtindholdet i foder kan variere nok i praksis til, at det er nødvendigt at korrigere herfor, hvis biomagnificeringsfaktorer skal kunne fremlægges på en fornuftig måde. Biomagnificeringsfaktoren bør korrigeres for vækstfortynding (som den kinetiske BCF i metoden med eksponering i vand) og for fedtindholdet i foderet i forhold til i fiskene (lipidkorrektionsfaktoren). Ligninger og eksempler på disse beregninger kan ses i henholdsvis tillæg 5 og 7.

For at korrigere for vækstfortynding bør den væstkorrigerede udskillelseshastighedskonstant (k_{2g}) beregnes (se tillæg 5 for ligninger). Denne væstkorrigerede udskillelseshastighedskonstant (k_{2g}) bruges derefter til at beregne den væstkorrigerede biomagnificeringsfaktor, jf. punkt 74. I nogle tilfælde er denne metode ikke mulig. I en alternativ tilgang, der omgår behovet for korrigeret for vækstfortynding, anvendes udskillelsesdata for teststofmasse pr. fisk (hel) i stedet for de normale (koncentrations)data for teststofmængde pr. enhed fiskemasse. Dette kan nemt opnås, da test i henhold til denne metode bør forbinde registrerede vævskoncentrationer med den enkelte fisks vægt. En enkel procedure hertil er beskrevet i tillæg 5. Bemærk, at k_2 stadig bør skønnes og rapporteres, også hvis det er den alternative metode, der anvendes.

For at korrigere for fedtindholdet i foderet og fiskene, når der ikke er foretaget en analyse for fedtindhold af alle udtagne fisk, udledes middelfedtfraktioner (vægt/vægt) i fiskene og foderet⁽¹⁾. Lipidkorrektionsfaktoren (L) beregnes derefter ved at dividere den gennemsnitlige lipidfraktion i fisk med den gennemsnitlige lipidfraktion i foderet. Biomagnificeringsfaktoren (væstkorrigeret, hvor det er relevant) divideres med lipidkorrektionsfaktoren for at beregne den lipidkorrigerede biomagnificeringsfaktor.

Hvis samme fisk analyseres for kemikalie og fedtindhold ved hvert udtagningspunkt, kan de lipidkorrigerede data for den enkelte fisks væv bruges til en direkte beregning af en lipidkorrigeret BMF (jf. (37)). Plottet over lipidkorrigerede koncentrationsdata giver $C_{0,d}$ på grundlag af fedtindhold og k_2 . Der kan derefter foretages en matematisk analyse, hvor der anvendes de samme ligninger i tillæg 7, men assimileringseffektiviteten (a) beregnes ved hjælp af den lipidnormaliserede hastighedskonstant for fødeoptagelse (I_{lipid}) og foderkoncentrationen på grundlag af fedtindhold ($C_{food-lipid}$). På samme måde bruges lipidkorrigerede parametre til at beregne BMF (bemærk, at korrigeringen for væksthastighedskonstanten også bør anvendes på lipidfraktionen i stedet for fiskens vådvægt til at beregne den lipidkorrigerede, væstkorrigerede BMFKgL).

Fortolkning af resultater

Gennemsnitlig vækst i både test- og kontrolgrupper bør i princippet, for at udelukke toksiske virkninger, ikke adskille sig væsentligt fra hinanden. Væksthastighedskonstanterne eller vækstkurverne for de to grupper sammenlignes med en passende procedure⁽²⁾.

Testrapport

Efter undersøgelsen udarbejdes der en endelig rapport, som skal indeholde oplysninger om *teststof*, *dyreart* og *testbetingelser* som anført i punkt 81 (som med metoden med eksponering i vand). Der kræves endvidere følgende oplysninger:

- (1) Denne tilgang er specifik for undersøgelsen af eksponering i foder, som adskiller sig fra den procedure, der følges i undersøgelsen af eksponering i vand, hvorfor ordene "korrigeret" og "korrektur" er anvendt i stedet for "normalisering" for at undgå forvirring — jf. også fodnoten til punkt 106.
- (2) Der kan foretages en t-test på væksthastighedskonstanterne for at undersøge, om der er forskelle i væksten mellem kontrol- og testgrupper, eller en F-test i tilfælde af variansanalyse. Der kan om nødvendigt gennemføres en F-test eller sandsynlighedskvotienttest som hjælp til at vælge en passende vækstmodel (OECD's monografi 54, (32)).

Teststof:

- oplysninger om prøvestoffets stabilitet i fremstillet foder.

Testbetingelser:

- den nominelle koncentration af stof i foder, spiking-teknik, mængde (lipid) bærestof, der anvendes i spikingen af foderet (hvis et sådant anvendes), målinger af teststofkoncentration i spiked foder til hver analyse (mindst tre målinger inden undersøgelsens begyndelse og optagelsesfasens slutning) og middelværdier
- type og kvalitet af eventuelt bærestofolie eller opløsningsmiddel (kvalitet, leverandør osv.) anvendt til at spike foder
- anvendt fodertype (omtrentlig analyse ⁽¹⁾, kvalitet, leverandør osv.), fodringsintervaller optagelsesfasen, administreret fodermængde og frekvens (inklusive eventuelle tilpasninger baseret på udtagne fisks vægt)
- tidspunkt, hvor fiskene indsamles og aflives med henblik på kemisk analyse for hvert prøveudtagningstidspunkt (f. eks. en time før den følgende dags fodring).

Resultater:

- resultater fra eventuelle forundersøgelser
- oplysninger om eventuelle negative virkninger
- fuldstændig beskrivelse af alle kemiske analyseprocedurer, herunder detektions- og kvantificeringsgrænser samt variation og genfindning
- målte fedtkoncentrationer i foder (spiked foder og kontrolfoder), individuelle værdier, gennemsnitsværdier og standardafvigelse
- i tabelform: data for den enkelte fisks vægt (og længde), både for kontrol- og eksponeringsgrupper (f.eks. ved at anvende unikke identifikatorer for hver fisk) og beregninger, afledte væksthastighedskonstant(er) og 95 %-konfidensintervaller
- i tabelform: data for teststoffets koncentration i fisk, gennemsnitlig målt koncentration ved optagelsesfasens slutning ($C_{0,m}$), og afledt (samlet) udskilleleshastighedskonstant (k_2) og koncentration i fisk ved udskillelsesfasens start ($C_{0,d}$) sammen med varianser i disse værdier (hældning og skæringspunkt)
- i tabelform: data for fedtindhold i fisk (sammenholdt med specifikke stofkoncentrationer, hvis disse foreligger), middelværdier for test- og kontrolgruppe ved testens start samt optagelses- og udskillelsesfasens slutning
- kurver (og alle målte data), der viser følgende (eventuelle koncentrationer kan udtrykkes både i forhold til hele dyrets krop eller specificeret væv deraf):
 - vækst (dvs. fiskens vægt (og længde) i forhold til tid) eller vægt i forhold til tid transformeret ved uddragelse af den naturlige logaritme
 - udskillelse af teststoffet i fiskene
 - koncentration transformeret ved uddragelse af den naturlige logaritme ($\ln$ koncentration) i forhold til udskillelsetid (herunder den afledte udskilleleshastighedskonstant k_2 og koncentration transformeret ved uddragelse af den naturlige logaritme i fisk ved udskillelsesfasens start, $C_{0,d}$)
- hvis en visuel undersøgelse af en kurve viser tydeligt ekstreme værdier, kan der anvendes en statistisk gyldig test for ekstreme værdier for at fjerne falske datapunkter, ledsaget af en dokumenteret begrundelse for, at de udelades

⁽¹⁾ En teknik til analyse af protein, fedtstof, grove fibre og aske i foderet; denne oplysning kan normalt fås fra leverandøren

- beregnet vækstkorrigeret udskillelseskoefficient og vækstkorrigeret halveringstid
- stoffets assimileringseffektivitet (α)
- "rå" BMF for foderet, kinetisk BMF korrigeret for fedt og vækstfortynding ("rå" og lipid-korrigeret på grundlag af hele fisks vådvægt), evt. vævsspecifik BMF
- oplysninger om radioaktivt mærket prøvestof, metabolitter og akkumulering deraf
- alle usædvanlige omstændigheder ved testen, eventuelle afvigelser fra proceduren samt alle andre relevante oplysninger
- en sammenfattende oversigt over relevante målte og beregnede data som følger:

Udskillelseshastighedskonstanter og biomagnificeringsfaktorer (BMF _k) for stof	
k_g (væksthastighedskonstant, dag ⁻¹):	Indsæt værdi (95 % CI) ⁽¹⁾
k_2 (samlet udskillelseshastighedskonstant, dag ⁻¹):	Indsæt værdi (95 % CI)
k_{2g} (vækstkorrigeret udskillelseshastighedskonstant, dag ⁻¹):	Indsæt værdi (95 % CI) ⁽¹⁾
$C_{0,m}$ (målt nulstillingskoncentration, koncentrationen i fisk ved optagelsesfasens slutning) (µg/g):	Indsæt værdi ± SD ⁽²⁾
$C_{0,d}$ (afledt nulstillingskoncentration efter udskillelsesfasen; µg/g):	Indsæt værdi ± SD ⁽²⁾
I (fastsat foderindtag; g foder/g fisk/dag):	Indsæt værdi
I_g (effektiv fodring, korrigeret for vækst; g foder/g fisk/dag) ⁽²⁾ :	Indsæt værdi ± SD ⁽²⁾
C_{food} (koncentration af kemikalie i foder, µg/g):	Indsæt værdi ± SD ⁽²⁾
α (stoffets assimileringseffektivitet):	Indsæt værdi ± SD ⁽²⁾
BMF _k (kinetisk BMF i foder):	Indsæt værdi (95 % CI) ⁽¹⁾
BCF _{kg} (vækstkorrigeret kinetisk BMF i foder):	Indsæt værdi (95 % CI) ⁽¹⁾
$T_{1/2g}$ (vækstkorrigeret halveringstid i dage):	Indsæt værdi ± SD ⁽²⁾
L_c (korrektionsfaktor for fedtindhold):	Indsæt værdi
BMF _{kgL} (fedtkorrigeret, vækstkorrigeret kinetisk BMF):	Indsæt værdi
BMF _{ss-L} (vejledende fedtkorrigeret BMF i ligevægt) ⁽²⁾ :	Indsæt værdi ± SD ⁽²⁾

⁽¹⁾ CI: konfidensinterval (hvor det er muligt at anslå).

⁽²⁾ SD: standardafvigelse (hvor det er muligt at anslå).

LITTERATUR

- (1) Chapter C.13 of this Annex, *Bioconcentration: Flow-through Fish Test*.
- (2) Chapter A.6 of this Annex, *Water Solubility*
- (3) Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. *Environ Toxicol Chem* 12: 2031-2035
- (4) Chapter A.8 of this Annex, *Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method*.
- (5) Chapter A.24 of this Annex, *Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method*.
- (6) Chapter A.23 of this Annex, *Partition Coefficient (1-Octanol/Water): Slow-Stirring Method*.
- (7) Chapter C.7 of this Annex, *Hydrolysis as a Function of pH*.
- (8) OECD (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Number 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water [OCDE/GD\(97\)21](#). Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
- (9) Chapter A.5 of this Annex, *Surface Tension of Aqueous Solutions*.
- (10) Chapter A.4 of this Annex, *Vapour Pressure*.
- (11) Chapter C.4 of this Annex, *Ready Biodegradability*.
- (12) Chapter C.29 of this Annex, *Ready Biodegradability — CO₂ in sealed vessels*
- (13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 102: 117-156.
- (14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.
- (15) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.
- (16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klammer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35: 4097-4102.
- (17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to commercially available pelletized fish food. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2058-2062.
- (18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2', 5,5'-tetrachlorobiphenyl. *Toxicol. Sci.* 77: 206-218.
- (19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 4: 139-155.
- (20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2436-2448.
- (21) Schlechtriem C., Flieger A. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. *Environmental Sciences Europe* 2012, 24:13. published: 3 April 2012.

- (22) Chapter C.47 of this Annex, *Fish, Early-Life Stage Toxicity Test*.
- (23) Chapter C.15 of this Annex, *Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages*.
- (24) Chapter C.14 of this Annex, *Fish, Juvenile Growth Test*.
- (25) OECD (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
- (26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.
- (27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.
- (28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA
- (29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- (30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. *Limnol. Oceanogr.* 30: 1099-1105.
- (31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *Analyst.* 124: 1711-1718.
- (32) OECD (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/MONO(2006)18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
- (33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271-2280.
- (34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.
- (35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.
- (36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.
- (37) Fisk A.T., Cymbalisky C.D., Bergman Å. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C₁₂- and C₁₆-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1775-1782.
- (38) Anonymous (2004), Fish, dietary bioaccumulation study — Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (39) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, *Toxicol. Environ. Chem.* 7: 173-189.
- (41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. *Chemosphere.* 14: 829-833.

- (42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.
 - (43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. Toxicol. Sci. 77: 219-229.
 - (44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.
 - (45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. Environ. Sci. Technol. 29: 2769-2777.
 - (46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.
 - (47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. Environ. Toxicol. Chem. 17: 951-961.
 - (48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2503-2517.
 - (49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.
 - (50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. Environ. Sci. Technol. 27: 1718-1728.
 - (51) OECD (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I — Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II — Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO (2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
-

Tillæg 1

DEFINITIONER OG ENHEDER

Assimilerings effektiviteten (a) er et mål for den relative mængde stof absorberet i organismen fra tarmen (a er ikke en enhed, men udtrykkes ofte i procent i stedet for som en fraktion).

Bioakkumulering betegnes normalt som en proces, hvor stoffets koncentration i en organisme når et niveau, der overstiger niveauet i det respiratoriske medium (f.eks. vand for en fisk eller luft for et pattedyr), foderet eller begge dele(1).

Ved biokoncentrering forstås en koncentrationsforøgelse af teststoffet i eller på en organisme (eller specificeret væv deraf) i forhold til koncentrationen af teststoffet i det omgivende medium.

Ved biokoncentreringsfaktoren (BCF eller K_b) på et givet tidspunkt under optagelsesfasen i denne akkumuleringstest forstås koncentrationen af teststoffet i/på fiskene eller specificeret væv deraf (C_f som mg/kg) divideret med koncentrationen af det kemiske stof i det omgivende medium (C_w som mg/l). BCF udtrykkes i $l \cdot kg^{-1}$. Bemærk, at korrektioner for vækst og/eller standardfedtindhold ikke er medregnet.

Ved biomagnetificering forstås en koncentrationsforøgelse af teststoffet i eller på en organisme (eller specificeret væv deraf) i forhold til koncentrationen af teststoffet i foderet.

Ved biomagnificeringsfaktoren (BMF) forstås koncentrationen af et stof i et rovdyr i forhold til koncentrationen i rovdyrets bytte (eller foder) ved ligevægt. I den metode, der er beskrevet i forsøgsmetoden, undgås eksponering i vandfasen omhyggeligt, og en BMF-værdi fra denne forsøgsmetode kan derfor ikke umiddelbart sammenlignes med en BMF-værdi fra en feltundersøgelse (hvor eksponering i vand og føde kan kombineres).

Fødebiomagnificeringsfaktoren (føde-BMF) anvendes i denne forsøgsmetode til at beskrive resultatet af eksponering i foder, hvor eksponering i vandfasen omhyggeligt undgås, og føde-BMF fra denne forsøgsmetode kan derfor ikke umiddelbart sammenlignes en BMF-værdi fra en feltundersøgelse (hvor eksponering i vand og føde kan kombineres).

Ved udskillelsesfasen eller fasen efter eksponering forstås det tidsrum efter overførsel af forsøgsfiskene fra et medium indeholdende teststoffet til et medium uden stoffet, hvor man undersøger udskillelsen (eller nettoafgivelsen) af stoffet fra forsøgsfiskene (eller specificeret væv deraf).

Ved hastighedskonstant for udskillelse (k_2) forstås den talværdi, der angiver hastigheden for koncentrationsfaldet af teststoffet i forsøgsfiskene (eller specificeret væv deraf), efter at de er overført fra et medium indeholdende teststoffet til et medium uden dette stof (k_2 udtrykkes i dag^{-1}).

Opløst organisk kulstof (DOC) er et mål for koncentrationen af kulstof hidrørende fra opløste organiske kilder i testmediet.

Ved eksponeringsfasen eller optagelsesfasen forstås det tidsrum, hvori fiskene udsættes for teststoffet.

Foderindtaget (I) er den gennemsnitlige mængde foder, som hver fisk æder pr. dag, i forhold til dens anslåede gennemsnitlige hele kropsvægt (udtrykt som g foder/g fisk pr. dag).

Ved den kinetiske biokoncentreringsfaktor (BCFK) forstås forholdet mellem hastighedskonstanten for optagelse, k_1 , og hastighedskonstanten for udskillelse, k_2 (dvs. k_1/k_2 — se tilsvarende definitioner i dette tillæg). I princippet skal værdien være sammenlignelig med BCF_{ss} (se definition ovenfor), men der kan forekomme afvigelser, hvis det ikke er sikkert, at der er opnået ligevægt, eller hvis der er anvendt korrektioner for vækst på den kinetiske BCF.

Den lipidnormaliserede kinetiske biokoncentreringsfaktor (BCF_{KL}) er normaliseret til en fisk med et fedtindhold på 5 %.

Den lipidnormaliserede, vækstkorregerede kinetiske biokoncentreringsfaktor ($BCF_{K_{GL}}$) er normaliseret til en fisk med et fedtindhold på 5 % og korrigeret for vækst i forsøgsperioden som beskrevet i tillæg 5.

Den lipidnormaliserede ligevægtsbiokoncentreringsfaktor (BCF_{SSL}) er normaliseret til en fisk med et fedtindhold på 5 %.

Et stof bestående af flere forskellige bestanddele defineres i REACH som et stof, der har mere end en bestanddel i en koncentration på 10-80 % (vægt/vægt).

Ved octanol-vand-fordelingskoefficienten (K_{OW}) forstås forholdet mellem et stofs opløselighed i *n*-octanol og vand ved ligevægt (metode A.8 (2), A.24 (3) og A.23 (4)), også betegnet P_{OW} . Logaritmen til K_{OW} benyttes som en indikation af et stofs potentiale for biokoncentrerung i vandorganismer.

Organiske kulstofpartikler (POC) er et mål for koncentrationen af kulstof hidrørende fra suspenderede organiske kilder i testmediet.

En fastfase-mikroekstraktion (SPME) er en analyseteknik uden opløsningsmiddel, der er udviklet med henblik på at fortynde systemer. I denne metode eksponeres en polymerbelagt fiber for den gasfase eller flydende fase, som indeholder den relevante analyt. Generelt kræves en minimumsanalysetid, således at der etableres ligevægtsforhold mellem faste og flydende faser, for så vidt angår de målte arter. Efterfølgende kan koncentrationen af den relevante analyt bestemmes direkte fra fiberen, eller efter at den er ekstraheret fra fiberen i et opløsningsmiddel, afhængigt af bestemmelsesteknikken.

Man taler om ligevægtstilstand i plottet over testkemikaliet i fisk (C_f) mod tid, når kurven bliver parallel med tidsaksen, når tre på hinanden følgende analyser af C_f i prøver, der er udtaget med mindst to dages mellemrum, ligger inden for ± 20 % af hinanden, og når der ikke er nogen signifikant stigning i C_f i tidsrummet mellem den første og den sidste vellykkede analyse. Ved pooling af prøver til analyse kræves der mindst fire på hinanden følgende analyser. For teststoffer, der optages langsomt, vil et interval på syv dage være mere passende.

Ligevægtsbiokoncentreringsfaktoren (BCF_{SS}) ændrer sig ikke væsentligt over et længere tidsrum, idet koncentrationen af teststoffet i det angivende medium er konstant i dette tidsrum (jf. Definition af ligevægt).

Totalt indhold af organisk kulstof (TOC) er et mål for koncentrationen af kulstof hidrørende fra alle organiske kilder i testmediet, herunder partikler og opløste kilder.

Ved hastighedskonstant for optagelse (k_1) forstås den talværdi, der angiver hastigheden for koncentrationsforøgelsen af teststoffet i eller på fiskene (eller specificeret væv deraf), når fiskene udsættes for stoffet (k_1 udtrykkes i l kg₋₁ dag₋₁).

Stoffer af ukendt eller variabel sammensætning, komplekse reaktionsprodukter eller biologisk materiale betegnes UVCB

Et kemikalie er et stof eller en blanding.

Et testkemikalie er et stof eller en blanding, der testes med denne forsøgsmetode.

LITTERATUR

- (1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

- (2) Kapitel A.8 i dette bilag, *Fordelingskoefficient (n-octanol/vand): Rystekolbemetoden*
 - (3) Kapitel A.24 i dette bilag, *Fordelingskoefficient (n-octanol/vand), HPLC-metoden.*
 - (4) Kapitel A.23 i dette bilag, *Fordelingskoefficient (1-octanol/vand): Slow-stirring-metoden*
-

Tillæg 2

NOGLE KEMISKE EGENSKABER VED ACCEPTABELT FORTYNDINGSVAND

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

Tillæg 3

FISKEARTER ANBEFALET TIL TEST

Anbefalet art	Anbefalet testtemperaturinterval (°C)	Anbefalet længde af testfisk (cm) ⁽²⁾
<i>Danio rerio</i> ⁽¹⁾ (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebrafisk	20-25	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Tykhovedet elritse	20-25	5,0 ± 2,0
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Skælkarpe	20-25	8,0 ± 4,0 ⁽³⁾
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel) Japansk risfisk	20-25	4,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Guppy	20-25	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei Centrarchidae) (Rafinesque)	20-25	5,0 ± 2,0
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Teleostei Salmonidae) (Walbaum) Regnbueørred	13-17	8,0 ± 4,0
<i>Gasterosteus aculeatus</i> (Teleostei, (Gasterosteidae) (Linnaeus) Trepigget hundestejle	18-20	3,0 ± 1,0

⁽¹⁾ Meyer *et al.* (1)

⁽²⁾ Det skal bemærkes, at i testen er vægt den foretrukne målestok for afvigelse, for så vidt angår størrelse og væksthastigheds-konstant. Det erkendes dog, at længde er en mere praktisk målestok, hvis fiskene skal vælges ud fra udseende ved et forsøgs start (dvs. fra stampopulationen).

⁽³⁾ Dette længdeinterval er beskrevet i forsøgsmetoder for nye kemiske stoffer osv., baseret på Japans lov om kontrol med kemiske stoffer (CSCL).

En række brakvands- og saltvandsarter er blevet anvendt i mindre omfang, f.eks.

Trommefisk	(<i>Leiostomus xanthurus</i>)
Fårehoved-tandkarpe	(<i>Cyprinodon variegatus</i>)
Stribefisk	(<i>Menidia beryllina</i>)
Brændingsaborre	(<i>Cymatogaster aggregata</i>)
»English sole«	(<i>Parophrys vetulus</i>)
»Staghorn sculpin«	(<i>Leptocottus armatus</i>)
Trepigget hundestejle	(<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
Havaborre	(<i>Dicentrarchus labrax</i>)
Løje	(<i>Alburnus alburnus</i>)

De i ovenstående tabel opregnede ferskvandsfisk er lette at opdrætte og/eller fremskaffe hele året, mens saltvands- og brakvandsarterne til dels kun findes i bestemte lande. De kan opdrættes enten i fiskedamme eller i laboratoriet under kontrollerede forhold med hensyn til sygdomme og parasitter, så testdyrene er sunde og af kendt afstamning. Disse fisk kan fås over det meste af verden.

LITTERATUR

- (1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231-236.
-

Tillæg 4

PRØVEUDTAGNINGSPÅN FOR TEST MED EKSPONERING I VAND OG FØDE

1. Teoretisk eksempel på en prøveudtagningsplan for komplet biokoncentreringstest med eksponering for et stof med $\log K_{ow} = 4$.

Udtagning af fiskeprøver	Tidspunkt for prøveudtagningen		Antal vandprøver ⁽¹⁾	Antal fisk pr. prøve ⁽¹⁾
	Mindste hyppighed (dage) ⁽²⁾	Supplerende prøveudtagning (dage) ⁽²⁾		
Optagelsesfase				
1	– 1		2 ⁽³⁾	4 ⁽⁴⁾
	0		2)	(3 ⁽⁶⁾)
2	0,3		2	4
		0,4	2)	(4)
3	0,6		2	4
		0,9	2)	(4)
4	1,2		2	4
		1,7	2)	(4)
5	2,4		2	4
		3,3	2)	(4)
6	4,7		2	4-8 ⁽⁵⁾
				(3 ⁽⁶⁾)
Udskillelsesfase				Fiskene overføres til vand uden teststof
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)

Udtagning af fiskeprøver	Tidspunkt for prøveudtagningen		Antal vandprøver ⁽¹⁾	Antal fisk pr. prøve ⁽¹⁾
	Mindste hyppighed (dage) ⁽²⁾	Supplerende prøveudtagning (dage) ⁽²⁾		
Optagelsesfase				
10	14,0		2	4-8 ⁽⁵⁾
		17,5		(4+3 ⁽⁶⁾)
I ALT				40-72 (48-80) ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Tallene i parentes angiver, hvor mange prøver (vand, fisk) der skal udtages, hvis der foretages supplerende prøveudtagning.

⁽²⁾ Forud for testen er k_2 for en $\log K_{OW}$ på 4,0 skønnet til $0,652^{-1}$ dage. Forsøgets samlede varighed sættes til $3 \times t_{ss} = 3 \times 4,6$ dage, dvs. 14 dage. For skøn af t_{ss} henvises der til tillæg 5.

⁽³⁾ Der udtages en vandprøve efter aftapning af vand svarende til mindst tre gange kammerets rumfang.

⁽⁴⁾ Disse fisk udtages fra stampopulationen.

⁽⁵⁾ Hvis der er behov for større præcision eller undersøgelser af metabolisme, der kræver flere fisk, bør disse navnlig udtages ved slutningen af optagelses- og udskillelsesfasen (jf. punkt 40).

⁽⁶⁾ Der kan være behov for yderligere tre fisk til analyse af fedtindhold, hvis det ikke er muligt at bruge samme fisk som dem, der blev udtaget til måling af stofkoncentrationer ved testens start, optagelsesfasens slutning og udskillelsesfasens afslutning. Det skal bemærkes, at det i mange tilfælde burde være muligt kun at bruge tre kontrollfisk (jf. punkt 56).

2. Teoretisk eksempel på prøveudtagningsplan for bioakkumuleringstest af stof i foder efter 10 dages optagelsesfase og 42 dages udskillelsesfase.

Prøveudtagning	Tidspunkt for prøveudtagningen		Antal foderprøver	Antal fisk pr. prøve	
	Dag i fase	Prøver af flere fisk?		Testgruppe	Kontrolgruppe
Optagelsesfase					
1	0	Mulig ⁽¹⁾ ⁽²⁾	3 — testgruppe	0	5-10
			3 — kontrolgruppe ⁽¹⁾		(8-13) ⁽²⁾
1A ⁽³⁾	1-3			5-10	5-10
2	10	Ja ⁽⁴⁾	3 — testgruppe	10-15 ⁽⁴⁾	5-10
			3 — kontrolgruppe ⁽¹⁾	(13-18) ⁽⁵⁾	(8-13) ⁽⁵⁾
Udskillelsesfase					
3	1	Ja ⁽⁴⁾		10-15 ⁽⁴⁾	5-10
4	2			5-10	5-10
5	4			5-10	5-10

Prøveudtagning	Tidspunkt for prøveudtagningen		Antal foderprøver	Antal fisk pr. prøve	
	Dag i fase	Prøver af flere fisk?		Testgruppe	Kontrolgruppe
Optagelsesfase					
6	7	Ja ⁽⁴⁾		10-15 ⁽⁴⁾	5-10
7	14			5-10	5-10
8	28			5-10	5-10
9	42	Ja ⁽⁴⁾		10-15 ⁽⁴⁾ (13-18) ⁽⁵⁾	5-10 (8-13) ⁽⁵⁾
I ALT				59-120 (63-126) ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾	50-110 (56-116) ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Tre foderprøver fra både kontrol- og testgruppe analyseret for teststofkoncentrationer og fedtindhold.

⁽²⁾ Fisk udtages fra stampopulationen så tæt ved undersøgelsens start som muligt. Mindst tre fisk fra stampopulationen bør udtages til analyse af fedtindhold ved teststart.

⁽³⁾ (Ikke-obligatorisk) prøveudtagning tidligt i optagelsesfasen giver data til beregning af teststoffets assimilering i foder, som kan sammenholdes med den assimileringseffektivitet, der beregnes ud fra data fra udskillelsesfasen.

⁽⁴⁾ Der kan udtages fem ekstra fisk til vævsspecifik analyse.

⁽⁵⁾ Der kan være behov for yderligere tre fisk til analyse af fedtindhold, hvis det ikke er muligt at bruge samme fisk som dem, der blev udtaget til måling af stofkoncentrationer ved testens start, optagelsesfasens slutning og udskillelsesfasens afslutning. Det skal bemærkes, at det i mange tilfælde burde være muligt kun at bruge tre kontrollfisk (jf. punkt 56 og 153).

Bemærkning vedrørende tidsplan for faser og prøveudtagning: Optagelsesfasen begynder ved første fodring med spiked foder. En forsøgsdag kører fra en fodring indtil kort før den næste, 24 timer senere. Den første prøveudtagning (1 i tabellen) bør finde sted umiddelbart før den første fodring (f.eks. en time). Prøveudtagning under en undersøgelse bør ideelt set ske kort før den følgende dags fodring (dvs. ca. 23 timer efter fodringen på prøveudtagningsdagen). Optagelsesfasen slutter kort før den første fodring med ikke-spiked foder, hvor udskillelsesfasen begynder (fiskene i testgruppen fordøjer sandsynligvis stadig det spiked foder i de mellemliggende 24 timer efter den sidste fodring med spiked foder). Det betyder, at der bør udtages en prøve ved optagelsesfasens slutning, kort tid før den første fodring med ikke-spiked foder, og den første prøve i udskillelsesfasen bør udtages ca. 23 timer efter den første fodring med ikke-spiked foder.

Tillæg 5

ALMINDELIGE BEREKNINGER

1. Indledning
2. Forudsigelse af optagelsesfasens længde
3. Forudsigelse af udskillelsesfasens længde
4. Sekventiel metode: bestemmelse af udskillelseshastighedskonstanten k_2
5. Sekventiel metode: bestemmelse af optagelseshastighedskonstanten k_1 (kun metoden med eksponering i vand)
6. Samtidig metode til beregning af hastighedskonstanterne for optagelse og udskillelse (tab) (kun metoden med eksponering i vand)
7. Korrigering for vækstfortyndning for kinetisk BCF og BMF
8. Lipidnormalisering til 5 % fedtindhold (kun for metoden med eksponering i vand)

1. INDLEDNING

Den almindelige model for fisk med bioakkumulering i vand kan beskrives i optagelses- og tabsprocesser, idet der ses bort fra optagelse fra foder. Den differentiaalligning (dC_f/dt), der beskriver ændringer i koncentrationen i fisk ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dag}^{-1}$) fås ved (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \quad [\text{Ligning A5.1}]$$

hvor

k_1 = Konstant af første orden for optagelse i fisk ($\text{l}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dag}^{-1}$).

k_2 = Konstant af første orden for udskillelse fra fisk (dag^{-1}).

k_g = Konstant af første orden for fisks vækst (»vækstfortyndning«) (dag^{-1})

k_m = Konstant af første orden for metabolisk transformation (dag^{-1}).

k_e = Konstant af første orden for fækal egestion (dag^{-1}).

C_w = Koncentration i vand ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

C_f = Koncentration i fisk ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ vådvægt).

For bioakkumulerende stoffer kan det forventes, at et tidsvægtet gennemsnit (TWA) er den mest relevante eksponeringskoncentration i vand (C_w) inden for det tilladte udsving (jf. punkt 24). Det anbefales at beregne et TWA for koncentration i vand ved hjælp af proceduren i tillæg 6 til TM C.20 (2). Det skal bemærkes, at ln-transformationen af vandkoncentrationen er velegnet, når der forventes et eksponentielt henfald mellem fornyelsesperioder, f.eks. i et semistatisk testdesign. I et gennemstrømningssystem er der ikke nødvendigvis behov for ln-transformation af eksponeringskoncentrationer. Hvis der udledes TWA-vandkoncentrationer, bør disse rapporteres og anvendes i efterfølgende beregninger.

I en standardtest for BCF i fisk kan optagelse og udskillelse beskrives som to kinetiske processer af første orden.

$$\text{Optagelseshastighed} = k_1 \times C_w \quad [\text{Ligning A5.2}]$$

$$\text{Generel tabshastighed} = (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \quad [\text{Ligning A5.3}]$$

Ved ligevægt, og hvor det antages, at vækst og metabolisme er ubetydelig (dvs. værdierne for k_g og k_m ikke kan skelnes fra nul), svarer optagelseshastigheden til udskillelseshastigheden, og ved at kombinere ligning A5.2 og ligning A5.3 fås derfor følgende forhold:

$$\text{BCF} = \frac{C_f - \text{ss}}{C_w - \text{ss}} = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{Ligning A5.4}]$$

hvor

$C_{f-\text{ss}}$ = koncentration i fiskene ved ligevægt (mg kg^{-1} vådvægt):

$C_{w-\text{ss}}$ = koncentration i vand ved ligevægt (mg l^{-1}).

Forholdet k_1/k_2 er kendt som den kinetiske BCF (BCF_k) og bør svare til ligevægts-BCF (BCF_{ss}) hidrørende fra forholdet mellem ligevægtskoncentrationen i fisk og i vand, men afvigelser kan forekomme, hvis ligevægtstilstanden var usikker, eller hvis der er korrigeret for vækst på kinetisk BCF. Men da k_1 og k_2 er konstanter, er ligevægt ikke et krav for at udlede en BCF_k .

På grundlag af disse førsteordensligninger omfatter tillæg 5 de generelle beregninger, som er nødvendige i både bioakkumuleringsmetoden med eksponering i vand og i foder. Afsnit 5, 6 og 8 er dog kun relevante for metoden med eksponering i vand, men er medtaget her, da der er tale om »generelle« teknikker. Den sekventielle metode (afsnit 4 og 5) og den samtidige metode (afsnit 6) kan benyttes til at beregne de optagelses- og udskillelseskonstanter, som anvendes til at udlede kinetiske BCF-værdier. Den sekventielle metode til at bestemme k_2 (afsnit 4) er vigtig for metoden med eksponering i foder, da den er nødvendig for at kunne beregne både assimileringseffektivitet og BMF. Tillæg 7 indeholder nærmere oplysninger om de beregninger, der er specifikke for metoden med eksponering i foder.

2. FORUDSIGELSE AF OPTAGELSESFASENS LÆNGDE

Før testen udføres, kan man ud fra en empirisk sammenhæng mellem k_2 og n -octanol/vand-fordelingskoefficienten (K_{OW}) eller k_1 og BCF foretage et skøn over k_2 , og dermed en procentdel af den tid, det vil kræve at opnå ligevægt. Det skal dog bemærkes, at ligningerne i dette afsnit kun gælder, når optagelse og udskillelse følger førsteordenskinetik. Hvis dette tydeligvis ikke er tilfældet, anbefales det at søge råd hos en biostatistiker og/eller en farmakokinetiker, hvis det er ønskeligt at forudsige optagelsesfasen.

Et skøn over k_2 (dag^{-1}) kan udarbejdes efter flere forskellige metoder. Eksempelvis kan følgende empiriske sammenhænge anvendes i første instans ⁽¹⁾:

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \log K_{\text{OW}} \quad (r^2=0,95) [(3), \text{ligning A5.5}]$$

Eller

$$k_2 = \frac{k_1}{\text{BCF}} \quad [\text{Ligning A5.6}]$$

$$\text{hvor } k_1 = 520 \times W^{-0,32} \text{ ((for stoffer med en } \log K_{\text{OW}} > 3)) \quad (r^2= 0,85) [(4), \text{Ligning A5.7}]$$

$$\text{Og } \text{BCF} = 10^{(0,910 \cdot \log K_{\text{OW}} - 1,975 \cdot \log(6,8 \cdot 10^{-7} K_{\text{OW}} + 1) - 0,786)} \quad (r^2= 0,90) [(5), \text{ligning A5.8}]$$

⁽¹⁾ Som det er tilfældet med alle empiriske sammenhænge, bør det kontrolleres, at teststoffet falder ind under anvendelsesområdet for forholdet.

W = gennemsnitlig fiskevægt (gram vådvægt) ved slutningen af optagelsesfasen/starten på udskillelsesfasen ⁽¹⁾

Der henvises til (6) for andre dermed relaterede forbindelser. Det kan være en fordel at anvende mere komplicerede modeller i forbindelse med ansættelsen af k_2 ; der kan f.eks. sandsynligvis forekomme betydelig metabolisme (7) (8). Men i takt med at modellen bliver mere og mere kompleks, bør der udvises større omhyggelighed i fortolkningen af hypoteserne. Tilstedeværelsen af nitrogrupper kan f.eks. være tegn på hurtig metabolisme, men dette er ikke altid tilfældet. Derfor bør brugeren afveje resultaterne af den prognostiske metode mod kemisk struktur og eventuelle andre relevante oplysninger (f.eks. forundersøgelser) i planlægningen af en undersøgelse.

Den tid, der går, til der indtræffer en bestemt procent ligevægt, kan beregnes ved at anvende k_2 -skønnet ud fra den generelle kinetiske ligning, der beskriver optagelse og udskillelse (førsteordenskinetik), hvis det antages, at der kun er ubetydelig vækst og metabolisme: Hvis der forekommer betydelig vækst i løbet af undersøgelsen, er nedenstående skøn ikke pålidelige. I så fald er det bedre at bruge den vækstkorrigerede k_{2g} som beskrevet senere (se afsnit 7 i dette tillæg):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_w - k_2 C_f \quad [\text{Ligning A5.9}]$$

eller, hvis C_w er konstant:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Ligning A5.10}]$$

Når der er næsten ligevægt ($t \rightarrow \infty$), kan ligning A5.10 reduceres (jf. (9)(10)) til:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad [\text{Ligning A5.11}]$$

eller

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \quad [\text{Ligning A5.12}]$$

Derefter er $BCF \times C_w$ en tilnærmelse til koncentrationen i fiskene ved ligevægt ($C_{f,ss}$). [Bemærk: samme fremgangsmåde kan anvendes ved ansættelsen af ligevægts-BMF i metoden med eksponering i foder. I dette tilfælde erstattes BCF med BMF og C_w med C_{fod} , koncentration i foderet, i ovenstående ligninger]

Ligning A5.10 kan omskrives til:

$$C_f = C_{f-ss} (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Ligning A5.13}]$$

eller

$$\frac{C_f}{C_{f-ss}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{Ligning A5.14}]$$

Ved at anvende ligning A5.14 kan man forudsige, hvor lang tid der går, indtil en vis procent af ligevægt er nået, når A_5 allerede er skønnet ved hjælp af ligning A5.5 eller A5.6.

Som rettesnor kan anføres, at den statistisk optimale længde af optagelsesfasen, når der ønskes statistisk acceptable data (BCF_K), er den tid, der går, indtil kurven over logaritmen til koncentrationen af teststoffet i fiskene plottet mod tiden har nået mindst 50 % ligevægt (dvs. $0,69/k_2$), men ikke over 95 % af ligevægt (dvs. $3,0/k_2$) (11). Hvis ophobningen overstiger 95 % ligevægt, kan en BCF_{ss} beregnes.

⁽¹⁾ Fiskenes vægt ved optagelsesfasens afslutning kan skønnes ud fra tidligere undersøgelsesdata eller viden om testartens sandsynlige stigning i størrelse fra en typisk vægt ved teststart over en typisk optagelsesfase (f.eks. 28 dage).

Den tid, det tager at nå 80 % ligevægt (ved hjælp af ligning A5.14):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{Ligning A5.15}]$$

eller

$$t_{80} = \frac{-\ln(0,20)}{k_2} = \frac{1,6}{k_2} \quad [\text{Ligning A5.16}]$$

På samme måde er den tid, det tager at nå 95 % ligevægt:

$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2} \quad [\text{Ligning A5.17}]$$

Eksempelvis er optagelsesfasens længde (dvs. tiden indtil der indtræder en vis procentdel ligevægt, f.eks. t_{80} og t_{95}) for et teststof med $\log K_{ow} = 4$ (ved hjælp af ligning A5.5, ligning A5.16 og ligning A5.17):

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0,652 \text{ dag}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1,6}{0,652} = 2,45 \text{ dage (59 timer)}$$

$$\text{eller } t_{95} = \frac{3,0}{0,652} = 4,60 \text{ dage (59 timer)}$$

Alternativt kan udtrykket:

$$t_{ess} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{ow} + 55,31 (\text{timer}) \quad [\text{Ligning A5.18}]$$

benyttes til beregning af, hvor lang tid der går til faktisk ligevægt (t_{ess}) (12). For et teststof med $\log K_{ow} = 4$ resulterer dette i:

$$t_{ess} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55,31 = 121 \text{ timer}$$

3. FORUDSIGELSE AF UDSKILLELSESFASENS LÆNGDE

Ud fra den generelle ligning, der beskriver optagelses- og udskillelseskinetikken (førsteordenskinetik), kan man ligeledes forudsige, hvor lang tid der kræves for, at legemsbelastningen falder til en vis procentdel af begyndelseskoncentrationen, jf. Ligning A5.9 (1) (13).

I udskillelsesfasen antages det, at C_w (eller C_{FOOD} for testen med foder) er nul. Ligningen kan da reduceres til:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \quad [\text{Ligning A5.19}]$$

eller

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \quad [\text{Ligning A5.20}]$$

hvor $C_{f,0}$ er koncentrationen ved udskillelsesperiodens begyndelse.

50 % udskillelse vil da være nået på tidspunktet (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

eller

$$t_{50} = \frac{-\ln(0,50)}{k_2} = \frac{0,693}{k_2}$$

Tilsvarende vil 95 % udskillelse være nået ved:

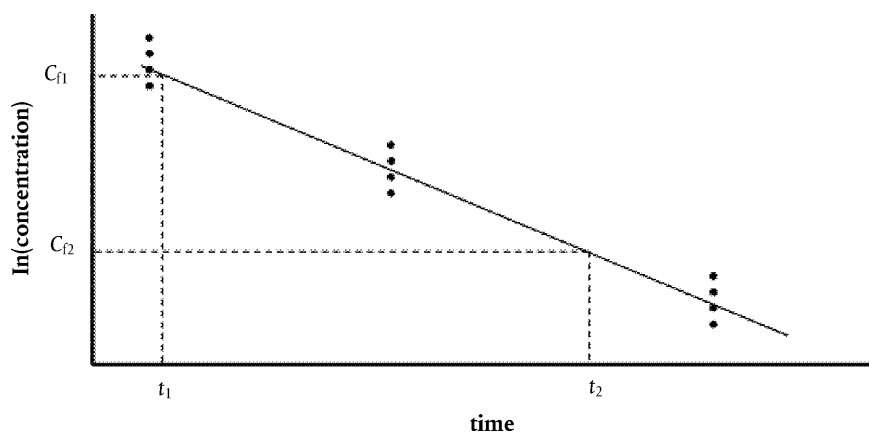
$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2}$$

Hvis der i den første periode benyttes 80 % optagelse ($1,6/k_2$), og der i udskillelsesfasen benyttes 2 % tab ($3,0/k_2$), bliver udskillelsesfasen omtrent dobbelt så lang som optagelsesfasen.

Det skal bemærkes, at skønnene er baseret på antagelsen om førsteordenskinetik for optagelse og udskillelse. Hvis det er åbenbart, at kinetikken ikke er af første orden, er disse skøn ikke gyldige.

4. SEKVENTIEL METODE: BESTEMMELSE AF UDSKILLELSESHASTIGHEDSKONSTANTEN K_2

De fleste biokoncentreringsdata antages at kunne beskrives »rimelig« godt ved en simpel model med to dele (»compartments«) og to parametre, hvilket fremgår af den retlinede kurve gennem punkterne for koncentrationen i fisk (på en ln-skala) i udskillelsesfasen.



Det skal bemærkes, at afvigelser fra en ret linje kan tyde på, at udskillelsens kinetik er mere kompleks end første orden. Den grafiske metode kan anvendes til løsning af udskillelse, der afviger fra førsteordenskinetik.

Til beregning af k_2 for flere tidspunkter (stikprøver) foretages der en lineær regression af $\ln(\text{koncentration})$ i forhold til tid. Regressionslinjens hældning er et estimat af udskillelseshastighedskonstanten k_2 ⁽¹⁾. Ud fra skæringspunktet kan den gennemsnitlige koncentration i fiskene ved udskillelsesfasens begyndelse ($C_{0,d}$, som svarer til den gennemsnitlige koncentration i fiskene ved optagelsesfasens afslutning) let beregnes (inklusive fejlmargener) ⁽¹⁾:

$$C_{0,d} = e^{\text{intercept}}$$

[Ligning A5.21]

⁽¹⁾ I de fleste programmer, der muliggør lineær regression, gives der også standardfejl og konfidensinterval (CI) for skønnene, f.eks. i Microsoft Excel ved hjælp af værktøjspakken Data Analysis.

For at beregne k_2 , hvis der kun er to tidspunkter (stikprøver) til rådighed (som i den begrænsede model), erstattes de to gennemsnitskoncentrationer i følgende ligning

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}) - \ln(C_{f2})}{t_2 - t_1} \quad [\text{Ligning A5.22}]$$

hvor $\ln(C_{f1})$ og $\ln(C_{f2})$ er de naturlige logaritmer til koncentrationer på henholdsvis tidspunkt t_1 og t_2 , og t_2 og t_1 er de tidspunkter, hvor de to prøver for begyndelsen af udskillelsesfasen blev udtaget ⁽¹⁾.

5. SEKVENTIEL METODE: BESTEMMELSE AF OPTAGELSESHASTIGHEDSKONSTANTEN k_1 (KUN METODEN MED EKSPONERING I VAND)

For at finde en værdi for k_1 ud fra et bestemt sæt sekventielle koncentrationsdata for optagelsesfasen benyttes software til fitning af følgende model:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Ligning A5.23}]$$

hvor k_2 er givet ved den tidligere beregning, og $C_f(t)$ og $C_w(t)$ er koncentrationerne i henholdsvis fisk og vand på tidspunktet t .

Til at beregne k_1 , når der kun er to tidspunkter (stikprøver) til rådighed (som i den begrænsede model), benyttes følgende formel:

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w(1 - e^{-k_2 t})} \quad [\text{Ligning A5.24}]$$

hvor k_2 er givet ved den tidligere beregning, C_f er koncentrationen i fisk ved udskillelsesfasens begyndelse, og C_w er den gennemsnitlige koncentration i vandet i optagelsesfasen ⁽²⁾.

Visuel inspektion af hældningerne k_1 og k_2 , når de plottes mod de målte prøveudtagningspunktdata, kan anvendes til at vurdere graden af egnethed. Hvis det viser sig, at sekvensmetoden har givet et dårligt skøn for k_1 , bør man anvende den samtidige tilgang til at beregne k_1 og k_2 (se næste afsnit 6). Også her bør de deraf fremkomne hældninger sammenholdes med de plottede, målte data med henblik på visuel vurdering af graden af egnethed. Hvis graden af egnethed fortsat er ringe, kan dette være en indikation af, at førsteordenskinetik ikke finder anvendelse, og at andre mere komplekse modeller bør anvendes.

6. SAMTIDIG METODE TIL BEREKNING AF HASTIGHEDSKONSTANTERNE FOR OPTAGELSE OG UDSKILLELSE (TAB) (KUN METODEN MED EKSPONERING I VAND)

Der kan anvendes software til at finde værdier for k_1 og k_2 ud fra et sæt sekventielle data for koncentration og tid og følgende model:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{Ligning A5.25}]$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad [\text{Ligning A5.26}]$$

hvor

t_c = tid ved afslutningen af optagelsesfasen.

⁽¹⁾ I modsætning til metoden med lineær regression giver denne formel ikke en standardfejl for k_2 .

⁽²⁾ I modsætning til en procedure med lineær fitning vil denne metode normalt ikke give en standardfejl eller et konfidensinterval for den anslåede k_1 .

Denne tilgang giver direkte standardfejl for skønnene af k_1 og k_2 . Når k_1/k_2 erstattes med BCF (jf. ligning A5.4) i ligning A5.25 og ligning A5.26, kan standardfejlen og et 95 % konfidensinterval for BCF anslås. Det er især nyttigt ved sammenligning af forskellige skøn på grund af transformation af data. Den afhængige variabel (koncentration i fisk) kan fittes med eller uden $\ln$ transformation, og den deraf følgende BCF-usikkerhed kan fastslås.

Eftersom der består en stærk korrelation mellem de to parametre k_1 og k_2 , hvis de skønnes samtidigt, er det undertiden bedst først at beregne k_2 ud fra udskillelsesdataene alene (se ovenfor); i de fleste tilfælde kan k_2 beregnes ud fra optagelseskurven med relativt stor sikkerhed. k_1 kan efterfølgende beregnes ved hjælp af ikke-lineær regression ⁽¹⁾. Det tilrådes at anvende samme datatransformation ved sekventiel fitting.

Visuel inspektion af de deraf afledte hældninger kan, når de plottes mod de målte prøveudtagningspunktdata, anvendes til at skønne graden af egnethed. Hvis det viser sig, at denne metode har givet et dårligt skøn for k_1 , kan den samtidige tilgang anvendes til at beregne k_1 og k_2 . Også her bør den fittede model sammenholdes med de afsatte målte data for visuel inspektion af graden af egnethed, og de deraf følgende parameterskøn for k_1 , k_2 og den deraf følgende BCF samt deres standardafvigelser og/eller konfidensintervaller bør sammenlignes for forskellige fittingstyper.

Hvis graden af egnethed er ringe, kan dette være en indikation af manglende førsteordenskinetik, og at andre mere komplekse modeller bør anvendes. En af de mest almindelige komplikationer er fiskevækst under testen.

7. KORRIGERING FOR VÆKSTFORTYNDING FOR KINETISK BCF OG BMF

I dette afsnit beskrives en standardmetode til at korrigere for fiskenes vækst under testen (såkaldt »vækstfortynding«), som kun er gyldig ved førsteordenskinetik. Hvis der er tegn på, at kinetikken ikke er af første orden, anbefales det at søge råd hos en biostatistiker vedrørende korrekt korrigering for vækstfortynding eller at anvende den nedenfor beskrevne massebaserede fremgangsmåde.

I nogle tilfælde er denne metode til at korrigere for vækstfortynding upræcis, og undertiden virker den ikke (for stoffer, der udskilles meget langsomt, og som der testes i hurtigt voksende fisk, kan den afledte udskillelseshastighedskonstant korrigeret for vækstfortynding, k_{2g} , f.eks. være meget lille, og dermed bliver fejlprocenten i de to hastighedskonstanter, der bruges til at udlede den, kritisk, og i nogle tilfælde kan skøn over k_g overstige skøn over k_2). I sådanne tilfælde kan der anvendes en alternativ metode (dvs. massetilgang), som også fungerer, når vækstkinetikken ikke er af første orden, hvilket fjerner behovet for korrigering. Denne fremgangsmåde er beskrevet i slutningen af dette afsnit.

Metode til subtraktion af væksthastighedskonstant med henblik på vækstkorrektion

Ved standardmetoden konverteres alle individuelle vægt- og længdedata til naturlige logaritmer, og $\ln(\text{vægt})$ eller $\ln(1/\text{vægt})$ plottes mod tid (dag), behandlings- og kontrolgrupper hver for sig. Samme proces gennemføres med data fra henholdsvis optagelses- og udskillelsesfasen. Generelt er det for korrigering for vækstfortynding mere hensigtsmæssigt at anvende vægtdata fra hele undersøgelsen for at udlede væksthastighedskonstanten (k_g), men statistisk signifikante forskelle mellem væksthastighedskonstanterne for optagelsesfasen og udskillelsesfasen kan indikere, at konstanten for udskillelsesfasen skulle have været anvendt. De samlede vækstrater fra undersøgelser med eksponering i vand for test- og kontrolgrupper kan anvendes til at kontrollere alle behandlingsrelaterede virkninger.

⁽¹⁾ Det er vigtigt at forstå, at den usikkerhed, der er forbundet med skønnet over k_2 , ikke anvendes korrekt i bioakkumuleringsmodellen, når den i vid udstrækning betragtes som konstant, når k_1 ittes i den sekventielle fittingsmetode. Den deraf følgende usikkerhed for BCF-værdien vil derfor ikke være den samme for den samtidige og den sekventielle fittingsmetode.

En lineær mindste kvadraters korrelation beregnes for $\ln(\text{vægt})$ i forhold til dag (og for $\ln(1/\text{vægt})$ i forhold til dag) for hver gruppe (test- og kontrolgrupper, individuelle data, ikke daglige gennemsnitsværdier) for hele undersøgelsen, optagelses- og udskillelsesfasen ved hjælp af statistiske metoder. Afvigelse i kurvernes hældninger beregnes og anvendes til at vurdere den statistiske signifikans ($p = 0,05$) af forskellen mellem hældninger (væksthastighedskonstanter) ved hjælp af t-testen (eller ANOVA, hvis der testes mere end en koncentration). Vægtdata foretrækkes generelt til væstkorrektion. Længdedata, der er behandlet på samme måde, kan bruges til at sammenligne kontrol- og testgrupper med hensyn til behandlingsrelaterede virkninger. Hvis der ikke er nogen statistisk signifikant forskel i analysen af vægtdata, kan test- og kontroldata samles og en overordnet væksthastighedskonstant for undersøgelsen (k_g) beregnes som den lineære korrelations samlede hældning. Hvis der observeres statistisk signifikante forskelle, rapporteres væksthastighedskonstanter for hver fiskegruppe og/eller undersøgelsesfase hver for sig. Hastighedskonstanten fra hver behandlet gruppe bør efterfølgende anvendes til at korrigere for vækstfortynding i denne gruppe. Hvis der konstateres statistiske forskelle mellem optagelses- og udskillelseshastighedskonstanter, bør hastighedskonstanter udledt fra udskillelsesfasen anvendes.

Den beregnede væksthastighedskonstant (k_g udtrykt som dag^{-1}) kan trækkes fra den samlede udskillelseshastighedskonstant (k_2) og giver så udskillelseshastighedskonstanten k_{2g} .

$$k_{2g} = k_2 - k_g \quad [\text{Ligning A5.27}]$$

Optagelseshastighedskonstanten divideres med den væstkorrigerede udskillelseshastighedskonstant og giver den væstkorrigerede kinetiske BCF, benævnt BCF_{k_g} (eller BMF_{k_g}).

$$\text{BCF}_{k_g} = \frac{k_1}{k_{2g}} \quad [\text{Ligning A5.28}]$$

Væksthastighedskonstanten udledt fra en undersøgelse af eksponering i foder anvendes i ligning A7.5 til at beregne den væstkorrigerede BMF_{k_g} (jf. tillæg 7).

Massebaseret metode til væstkorrektion

Et alternativ til ovennævnte »metode til subtraktion af væksthastighedskonstant«, hvor der ikke er behov for at korrigere for vækst, kan anvendes som følger: Princippet er at anvende udskillelsesdata på massebasis pr. hel fisk i stedet for på et koncentrationsgrundlag.

Vævs koncentrationer fra udskillelsesfasen (masse af teststof/fiskemasseenhed) konverteres til masse af teststof/fisk: koncentrationer og de enkelte fisks vægt opstilles i tabelform (f.eks. ved hjælp af et elektronisk regneark), og hver koncentration multipliceres med fiskenes samlede vægt, således at denne måling giver et sæt masse teststof/fisk for alle prøver fra udskillelsesfasen.

Den deraf resulterende naturlige logaritme for stofmassedata plottes mod tid for forsøget (udskillelsesfasen), som man normalt ville gøre.

For metoden med eksponering i vand udledes optagelseshastighedskonstanten rutinemæssigt (se afsnit 4 og 6). Det bemærkes, at den »normale« k_2 -værdi bør anvendes i kurvefitningsligningerne for k_1 , og hastighedskonstanten udledes af ovennævnte data. Fordi den fremkomne værdi for udskillelseshastighedskonstanten er uafhængig af vækst, fordi den er beregnet ud fra et massegrundlag pr. hel fisk, bør den benævnes k_{2g} og ikke k_2 .

8. LIPIDNORMALISERING TIL 5 % FEDTINDHOLD (KUN FOR METODEN MED EKSPONERING I VAND)

BCF-resultater (kinetisk og ligevægt) fra test med eksponering i vand bør også anføres i forhold til et standard-fedtindhold på 5 % vådvægt, medmindre det kan hævdes, at teststoffet ikke primært opkoncentreres i fedtvæv (f. eks. kan visse perflourinerede stoffer binde til proteiner). Data for koncentration i fisk, eller BCF, skal konverteres til et 5 % fedtindhold på vådvægtsbasis. Hvis de samme fisk er anvendt til at måle stofkoncentrationer og fedtindhold ved alle prøveudtagningspunkter, kræver dette, at hver enkelt målte koncentration i fisk korrigeres for dette fedtindhold.

$$C_{fL} = \frac{0,05}{L} \cdot C_f \quad [\text{Ligning A5.29}]$$

hvor

C_{fL} = lipidnormaliseret koncentration i fisk (mg kg^{-1} vådvægt)

L = lipidfraktion (baseret på vådvægt)

C_f = koncentration af teststof i fisk (mg kg^{-1} vådvægt)

Hvis der ikke er foretaget en fedtanalyse på alle udtagne fisk, anvendes en gennemsnitlig middelværdi for fedtindhold til at normalisere BCF. Til ligevægts-BCF bør den middelværdi, der er registreret ved afslutningen af optagelsesfasen, bruges i behandlingsgruppen. Til normaliseringen af en kinetisk BCF kan der være tilfælde, hvor en anden tilgang er berettiget, f.eks. hvis fedtindholdet har ændret sig markant under optagelses- eller udskillelsesfasen. En fodermængde, der minimerer dramatiske ændringer i fedtindholdet, bør dog under alle omstændigheder anvendes rutinemæssigt.

$$BCF_{KL} = \frac{0,05}{L_n} \cdot BCF_K \quad [\text{Ligning A5.30}]$$

hvor

BCF_{KL} = lipidnormaliseret kinetisk BCF, (L kg^{-1})

L_n = gennemsnitlig lipidfraktion (baseret på vådvægt)

BCF_K = kinetisk BCF (L kg^{-1})

LITTERATUR

- (1) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343-2355.
- (2) Chapter C.20 of this Annex, *Daphnia magna* Reproduction Test.
- (3) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1: 309-320.
- (4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (5) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.

-
- (6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.
- (7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.
- (8) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.
- (9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. *T. Am. Fish. Soc.* 104: 785-792.
- (10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in *Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals*, Sheeman, P., *et al.*, Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.
- (11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. *Can. J. Chem. Eng.* 55: 614-622.
- (12) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22: 701-707.
- (13) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. *Chemosphere.* 9: 3-19.
-

Tillæg 6

LIGNING TIL TEST MED EKSPONERING I VAND: BEGRÆNSET TESTDESIGN

Begrundelsen for denne fremgangsmåde er, at biokoncentreringsfaktoren i en komplet test enten kan bestemmes som en ligevægtsbiokoncentreringsfaktor (BCF_{ss}) ved at beregne forholdet mellem teststoffets koncentration i fiskenes væv og i vand, eller ved at beregne den kinetiske biokoncentreringsfaktor (BCF_k) som forholdet mellem optagelseshastighedskonstanten k_1 og udskillelshastighedskonstanten k_2 . BCF_k er gyldig, selv om et stofs ligevægtskoncentration ikke opnås under optagelsesfasen, forudsat at optagelse og udskillelse omtrent fungerer i henhold til kinetiske processer af første orden.

Hvis stoffets koncentration i væv (C_f) måles på det tidspunkt, hvor eksponeringen afsluttes (t_1), og koncentrationen i væv (C_f) måles igen efter et bestemt tidsrum (t_2), kan hastighedskonstanten for udskillelse (k_2) anslås ved hjælp af ligning A5.22 i tillæg 5.

Hastighedskonstanten for optagelse, k_1 , kan beregnes ved hjælp af ligning A5.23 i tillæg 5 (hvor $C_t = C_{f1}$ og $t = t_1$) (1). Den kinetiske biokoncentreringsfaktor i det begrænsede testdesign (betegnet BCF_{km} for at skelne den fra kinetiske biokoncentreringsfaktorer, der bestemmes ved hjælp af andre metoder), er derfor:

$$BCF_{km} = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{Ligning A6.1}]$$

Koncentrationer eller resultater bør korrigeres for vækstfortynding og normaliseres til et fedtindhold på 5 % som beskrevet i tillæg 5.

Den minimerede BCF_{ss} er BCF beregnet ved afslutningen af optagelsesfasen, idet det forudsættes, at der er indtruffet ligevægt. Dette kan kun være et skøn, da antallet af prøveudtagningspunkter ikke er tilstrækkelige til at dokumentere dette.

$$\text{minimeret } BCF_{ss} = \frac{C_{f - \text{minSS}}}{C_{w - \text{minSS}}} \quad [\text{Ligning A6.2}]$$

hvor

$C_{f-\text{minSS}}$ = Koncentration i fisk ved anslået ligevægt ved slutningen af optagelsesfasen (mg kg⁻¹ vådvægt)

$C_{w-\text{minSS}}$ = Koncentration i vand ved anslået ligevægt ved slutningen af optagelsesfasen (mg l⁻¹)

LITTERATUR

- (1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

Tillæg 7

LIGNING FOR TEST MED EKSPONERING I FODER

1. Eksempel på mængder af bestanddele i egnet, kommercielt fiskefoder
2. Eksempler på spiking-teknik
3. Beregning af assimileringseffektivitet og biomagnificeringsfaktor
4. Lipidkorrektur
5. Evaluering af forskelle mellem målt nulstillingskoncentration (C_{0,m}) og afledt nulstillingskoncentration (C_{0,d})
6. Vejledning til meget hurtigt udskilte teststoffer

1. EKSEMPEL PÅ MÆNGDER AF BESTANDDELE I EGNET, KOMMERCIELT FISKEFODER

Hovedbestanddel	Fiskemel
Råprotein	≤ 55,0 %
Råfedt	≤ 15,0 % ⁽¹⁾
Træstof	≥ 2,0 %
Vandindhold	≥ 12 %
Aske	≥ 8 %

⁽¹⁾ I nogle regioner kan man muligvis kun få fiskefoder med en fedtkoncentration, der slet ikke når op på denne øvre grænse. I så fald bør casestudierne gennemføres med foder med en lavere fedtkoncentration, og fodermængden kan tilpasses tilsvarende for at opretholde fiskenes sundhedstilstand. Foderets fedtindhold bør ikke øges kunstigt ved tilsætning af ekstra olie.

2. EKSEMPLER PÅ SPIKING-TEKNIK

Almindelige bestemmelser

Kontrolfoder bør være fremstillet på nøjagtig samme måde som det spikede foder, men uden teststof.

For at kontrollere koncentrationen i det behandlede foder bør tredobbelte prøver af det doserede foder ekstraheres ved hjælp af en passende ekstraktionsprocedure, og teststoffets koncentration eller radioaktivitet i det ekstraherede foder måles. Der bør påvises høje genfindinger ved analyser (> 85 %) med lav variation mellem prøverne (tre prøvekoncentrationer for stoffet, der udtages ved testens start, bør ikke variere mere end ± 15 % fra middelværdien).

Under testen med eksponering i foder bør der indsamles tre foderprøver til analyse på dag 0 og ved optagelsesfasens afslutning for at bestemme indholdet af teststof i foderet.

Fremstilling af fiskefoder med et flydende testmateriale (rent)

Der fastsættes en nominel måltestkoncentration i det behandlede fiskefoder, f.eks. 500 µg teststof/g foder. En passende mængde (ud fra molmasse eller specifik radioaktivitet) rent teststof tilsættes til en kendt masse fiskefoder i en glasbeholder eller rotationsfordamper. Massen af fiskefoder bør være tilstrækkelig til hele optagelsesfasen (under hensyntagen til behovet for at øge mængden ved hver fodring på grund af fiskenes vækst). Fiskefoderet/teststoffet bør blandes langsomt i løbet af natten (f.eks. ved hjælp af en rotationsmixer eller ved langsom rotation, hvis der anvendes en rotationsfordamper). Det spikede foder bør opbevares under forhold, der gør det muligt at bevare teststoffets stabilitet i foderblandingen (f.eks. på køl).

Fremstilling af fiskefoder med et majs- eller fiskeoliebærestof

Teststoffer i fast form bør males til et fint pulver i en morter. Teststoffer i væskeform kan tilsættes direkte til majs- eller fiskeolien. Prøvestoffet opløses i en kendt mængde majs- eller fiskeolie (f.eks. 5-15 ml). Den doserede olie overføres kvantitativt til en rotationsfordamper af passende størrelse. Den kolbe, der anvendes til at fremstille den doserede olie, bør skylles med to små delprøver olie, og disse hældes i rotationsfordamperen for at sikre, at alt opløst teststof overføres. For at sikre fuldstændig opløsning/opslæmning i olien (eller hvis der bruges mere end et teststof i undersøgelsen) anbringes en mikrorører i kolben, som tilproppes, hvorefter blandingen blandes under hurtig omrøring natten over. En passende mængde fiskefoder (normalt i pilleform) til testen tilsættes rotationsfordamperen, og dennes indhold blandes homogent ved konstant at dreje kolben i mindst 30 minutter, men helst natten over. Derefter opbevares det spikede foder på passende vis (f.eks. i køleskab) for at sikre teststoffets stabilitet i foderet indtil brug.

Fremstilling af fiskefoder med et organisk opløsningsmiddel

En passende mængde teststof (ud fra molmasse eller specifik radioaktivitet), der er tilstrækkelig til at opnå måldosis, opløses i et egnet organisk opløsningsmiddel (f.eks. acetone eller cyclohexan, 10-40 ml, men om nødvendigt en større mængde afhængigt af den fodermængde, der skal spikes). En alikvot af eller hele (tilsats portionsvis) opløsningen blandes med en passende mængde fiskefoder for at nå op på det krævede nominelle dosisniveau. Foderet/teststoffet kan blandes i en rustfri skål, og det nydoserede fiskefoder forblive i skålen i et stinkskab i to dage (med lejlighedsvis omrøring), således at overskydende opløsningsmiddel kan fordampe, eller blandes i en rotationsfordamper med konstant rotation. Det overskydende opløsningsmiddel kan »blæses« af med luft eller nitrogen. Det bør sikres, at teststoffet ikke krystalliserer, når opløsningsmidlet fjernes. Det spikede foder bør opbevares under betingelser, der gør det muligt at bevare teststoffets stabilitet i foderblandingen (f.eks. på køl).

3. BEREGNING AF ASSIMILERINGSEFFEKTIVITET OG BIOMAGNIFICERINGSFAKTOR

For at beregne assimileringseffektiviteten bør den samlede udskilleleshastighedskonstant først bestemmes i henhold til afsnit 4 i tillæg 5 (her anvendes den »sekventielle metode«, dvs. lineær standardregression) ved hjælp af gennemsnitlige prøvekoncentrationer fra udskillelsesfasen. Fodringshastighedskonstanten I og optagelsens varighed t er kendte parametre. C_{foder} , den gennemsnitlige målte koncentration af teststoffet i foderet, er en målt variabel i undersøgelsen. $C_{0,d}$, teststoffets koncentration i fiskene ved optagelsesfasens afslutning, udledes normalt af skæringspunktet mellem en graf over $\ln(\text{koncentration})$ mod udskillelsesdag.

Stoffets assimileringseffektivitet (a , absorption af teststoffet i tarmen) beregnes som:

$$a = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{\text{food}}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \quad [\text{Ligning A7.1}]$$

hvor:

$C_{0,d}$ = udledt koncentration i fisk ved nulstilling af udskillelsen (mg kg^{-1})

k_2 = samlet (ikke vækstkorrigeret) udskillelseshastighedskonstant (dag^{-1}), beregnet efter ligningerne i tillæg 5, afsnit 3

I = hastighedskonstant for foderindtagelse ($\text{g fødevarer g}^{-1} \text{ fisk dag}^{-1}$).

C_{food} = koncentration i foder ($\text{mg kg}^{-1} \text{ foder}$)

t = fordringsperiodens varighed (dag)

Det kan dog blive nødvendigt at tilpasse den fodermængde I , der er anvendt til beregningen, til fiskenes vækst for at give en præcis assimileringseffektivitet, a . I en test, hvor fiskene vokser meget i optagelsesfasen (uden at fodermængden korrigeres for at beholde den fastsatte fodermængde) vil den effektive fodermængde i løbet af optagelsesfasen være lavere end den fastsatte, hvilket vil resultere i en højere »reel« assimileringseffektivitet. (Det skal bemærkes, at dette ikke er vigtigt for den samlede beregning af BMF, da I effektivt ophæves mellem ligning A7.1 og ligning A7.4). Den gennemsnitlige fodermængde korrigeret for vækstfortynding, I_g , kan beregnes på flere forskellige måder, men en enkel og præcis metode er at bruge den kendte væksthastighedskonstant (k_g) til at anslå testfiskenes vægt på forskellige tidspunkter i optagelsesfasen, dvs.:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g t} \quad [\text{Ligning A7.2}]$$

hvor

$W_f(t)$ = fiskenes gennemsnitlige vægt på optagelsesdag t

$W_{f,0}$ = fiskenes gennemsnitlige vægt ved forsøgets start

På denne måde kan (som minimum) fiskenes gennemsnitlige vægt på den sidste eksponeringsdag ($W_{f,\text{end-of-uptake}}$) anslås. Da fodermængden er fastsat på baggrund af $W_{f,0}$, kan den effektive fodermængde for hver optagelsesdag beregnes ved hjælp af disse to vægtværdier. Den vækstkorrigerede fodermængde, I_g ($\text{g foder g}^{-1} \text{ fisk dag}^{-1}$), som kan anvendes i stedet for I i tilfælde af kraftig vækst i optagelsesfasen, kan derefter beregnes som

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,\text{end-of-uptake}}} \quad [\text{Ligning A7.3}]$$

Når assimileringseffektiviteten er opnået, kan BMF beregnes ved at multiplicere den med fodringshastighedskonstanten I (eller I_g , hvis denne er anvendt til at beregne a) og dividere resultatet med den samlede udskillelseshastighedskonstant k_2 :

$$\text{BMF} = \frac{I \times a}{k_2} \quad [\text{Ligning A7.4}]$$

Den vækstkorrigerede biomagnificeringsfaktor bør også beregnes på samme måde under anvendelse af den vækstkorrigerede udskillelseshastighedskonstant (som udledt i henhold til punkt 7 i tillæg 5). Hvis I_g er anvendt til at beregne a , bør den også anvendes her i stedet for I :

$$\text{BMF} = \frac{I \times a}{k_{2g}} \quad [\text{Ligning A7.5}]$$

hvor:

α = assimileringseffektivitet (absorption af teststoffet i tarmen)

k_2 = samlet (ikke vækstkorrigeret) udskilleleshastighedskonstant (dag^{-1}), beregnet efter ligningerne i tillæg 5, afsnit 3

k_{2g} = vækstkorrigeret udskilleleshastighedskonstant (dag^{-1})

I = hastighedskonstant for foderindtagelse ($\text{g fødevarer g}^{-1}$ fisk dag^{-1}).

Den vækstkorrigerede halveringstid ($t_{1/2}$) beregnes som følger:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{2g}} \quad [\text{Ligning A7.6}]$$

Stoffets assimileringseffektivitet fra foderet kan også anslås, hvis vævsrester bestemmes i løbet af optagelsesfasens lineære fase (mellem dag 1 og 3). I dette tilfælde kan stoffets assimileringseffektivitet (α) bestemmes som følger

$$\alpha = \frac{C_{\text{fish}}(t)}{I \times C_{\text{food}} \times t} \quad [\text{Ligning A7.7}]$$

hvor

$C_{\text{fish}}(t)$ = koncentrationen af teststof i fiskene på tidspunkt t (mg kg^{-1} vådvægt)

4. LIPIDKORREKTION

Hvis fedtindholdet er målt på de samme fisk, som der blev foretaget en kemisk analyse af ved alle prøveudtagningsintervaller, burde de enkelte koncentrationer korrigeres på grundlag af fedtindhold og $\ln(\text{koncentration, lipidkorrigeret})$ plottes i forhold til udskillelse (dag) for at beregne $C_{0,d}$ og k_2 . Assimileringseffektiviteten (ligning A7.1) kan derefter beregnes på et lipidgrundlag ved at anvende C_{food} på et lipidgrundlag (dvs. at C_{food} multipliceres med den gennemsnitlige lipidfraktion i foderet). Efterfølgende beregning ved hjælp af ligning A7.4 og ligning A7.5 vil give den lipidkorrigerede (og vækstfortyndingskorrigerede) BMF direkte.

I modsat fald udledes lipidfraktionen (vægt/vægt) i fiskene og foderet for både behandlings- og kontrolgruppen (for fisk i foder- og kontrolgruppen sker dette normalt på baggrund af data, der er målt ved eksponeringens begyndelse og ophør. For fisk i behandlingsgruppen sker dette normalt på baggrund af data, der kun er målt efter eksponeringen). I nogle undersøgelser kan fedtindholdet i fiskene stige markant; i sådanne tilfælde er det mere hensigtsmæssigt at anvende en gennemsnitlig fedtkoncentration beregnet ud fra de målte værdier ved eksponeringens og udskillelsens afslutning. Generelt bør kun data fra behandlingsgruppen anvendes til at udlede de to lipidfraktioner.

Lipidkorrektionsfaktoren (L_c) beregnes som:

$$L_c = \frac{L_{\text{fish}}}{L_{\text{food}}} \quad [\text{Ligning A7.8}]$$

hvor L_{fish} og L_{food} er de gennemsnitlige lipidfraktioner i henholdsvis fisk og foder.

Lipidkorrektionsfaktoren anvendes til at beregne den lipidkorrigerede biomagnificeringsfaktor (BMF_L):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_c} \quad [\text{Ligning A7.9}]$$

5. EVALUERING AF FORSKELLE MELLEM MÅLT NULSTILLINGSKONCENTRATION ($C_{0,m}$) OG AFLEDT NULSTILLINGSKONCENTRATION ($C_{0,d}$)

Den målte nulstillingskoncentration ($C_{0,m}$) og den afledte nulstillingskoncentration ($C_{0,d}$) bør sammenlignes. Hvis de ligger meget tæt på hinanden, underbygger dette førsteordensmodellen, der blev brugt til at udlede udskillelsesparametrene.

I nogle undersøgelser kan der være en markant forskel mellem den afledte nulstillingsværdi, $C_{0,d}$, og den gennemsnitlige målte nulstillingskoncentration, $C_{0,m}$ (jf. sidste led i punktopstillingen i punkt 159 i denne forsøgsmetode). Hvis $C_{0,d}$ er meget lavere end $C_{0,m}$ ($C_{0,d} \ll C_{0,m}$), kan forskellen indikere tilstedeværelse af ufordøjet, spiket foder i tarmen. Dette kan efterprøves ved at foretage separate analyser af den fjernede tarm, hvis der er udtaget og opbevaret yderligere prøver (hel fisk) ved optagelsesfasens afslutning. Hvis en statistisk gyldig test for afvigende værdier anvendt på udskillelsesfasens lineære regression indikerer, at det første prøveudtagningspunkt i udskillelsen er fejlagtigt højt, kan det ellers være hensigtsmæssigt at udføre den lineære regression for at udlede k_2 , men udelade det første udskillelseskonzentrationspunkt. Hvis usikkerheden i den lineære regression i sådanne tilfælde er kraftigt reduceret, og det står klart, at udskillelseskinetikken var af omtrentlig første orden, kan det være hensigtsmæssigt at anvende de resulterende $C_{0,d}$ - og k_2 -værdier i beregningen af assimileringseffektiviteten. Dette bør begrundes behørigt i rapporten. Det er også muligt, at kinetikken ikke var af første orden i udskillelsesfasen. Hvis dette er sandsynligt (dvs. at data transformeret ved uddragelse af den naturlige logaritme ser ud til at følge en kurve sammenlignet med den lige, lineære regression), er det usandsynligt, at beregningerne af k_2 og $C_{0,d}$ er gyldige, og der bør søges rådgivning fra en biostatistiker.

Hvis $C_{0,d}$ er langt højere end den målte værdi ($C_{0,d} \gg C_{0,m}$), kan dette være et udtryk for, at stoffet blev udskilt meget hurtigt (dvs. at visse prøveudtagningspunkter nærmede sig analysemetodens kvantificeringsgrænse meget tidligt i udskillelsesfasen, jf. nedenstående afsnit 6), at der var en afvigelse fra udskillelseskinetikken af første orden, at den lineære regression for at udlede k_2 og $C_{0,d}$ er mangelfuld, eller at der opstod et problem med de målte koncentrationer på nogle prøveudtagningspunkter i undersøgelsen. I sådanne tilfælde bør grafen over den lineære regression kontrolleres for tegn på prøver ved eller i nærheden af kvantificeringsgrænsen, for ekstremt afvigende værdier og for indlysende krumning (der tyder på, at kinetikken ikke var af første orden), og fremhæves i rapporten. En eventuel efterfølgende revurdering af den lineære regression for at forbedre anslåede værdier bør beskrives og begrundes. Hvis der observeres en markant afvigelse fra førsteordenskinetik, er det usandsynligt, at beregningerne af k_2 og $C_{0,d}$ er gyldige, og det tilrådes at søge rådgivning fra en biostatistiker.

6. VEJLEDNING TIL MEGET HURTIGT UDSKILTE TESTSTOFFER

Som nævnt i forsøgsmetodens punkt 129 kan nogle stoffer udskilles så hurtigt, at det ikke er muligt at udlede en pålidelig nulstillingskoncentration, $C_{0,d}$, og k_2 kan ikke udledes, fordi stoffet i prøver, der er udtaget meget tidligt i udskillelsesfasen (dvs. fra den anden udskillelsesprøve og derefter), reelt ikke længere måles (koncentrationer, der ligger ved kvantificeringsgrænsen). Denne situation blev observeret i den ringtest, der blev udført som støtte for denne forsøgsmetode med benzo[a]pyren, og er dokumenteret i valideringsrapporten vedrørende metoden. I sådanne tilfælde kan den lineære regression ikke udføres sikkert og vil sandsynligvis give et urealistisk højt skøn over $C_{0,d}$, hvilket resulterer i en tilsyneladende assimileringseffektivitet, der er meget større end 1. Det er muligt at anlægge et konservativt skøn over k_2 og en »øvre grænse-BMF« i disse tilfælde.

Anvendes disse datapunkter i udskillelsesfasen, hvor der er målt en koncentration op til og med den første »ikke-registrerbare« koncentration (koncentration fastsat til kvantificeringsgrænsen), giver en lineær regression (ved hjælp af koncentrationsdata transformeret ved uddragelse af den naturlige logaritme i forhold til tid) et skøn over k_2 . I disse tilfælde involverer dette sandsynligvis kun to datapunkter (f.eks. prøvedag 1 og 2 i udskillelsesfasen), og derefter kan k_2 anslås ved hjælp af ligning A5.22 i tillæg 5. Dette skøn over k_2 kan anvendes til at anslå en assimileringseffektivitet i henhold til ligning A7.1, idet $C_{0,d}$ -værdien i ligningen med den målte nulstillingskoncentration ($C_{0,m}$) udskiftes i de tilfælde, hvor $C_{0,d}$ klart skønnes at være langt højere, end hvad der kunne opnås i testen. Hvis $C_{0,m}$ ikke kan måles, bør detektionsgrænsen i fiskevæv anvendes. Hvis dette i nogle tilfælde giver en værdi på $\alpha > 1$, antages assimileringseffektiviteten at være 1 som et »worst case-scenarie«.

Den maksimale BMF_k kan derefter beregnes ved hjælp af ligning A7.4 og bør angives som en »meget mindre end«-værdi ($<<$). For en undersøgelse med en fodermængde på 3 %, en udskillelseshalveringstid på under tre dage og et »worst case- α « på 1 forventes BMF_k at være under ca. 0,13. I lyset af formålet med dette skøn, og det forhold, at værdier vil være konservative, er det ikke nødvendigt at korrigere dem for vækstfortynding eller fedtindholdet i fisk og foder.

Tillæg 8

METODER TIL AT ANSLÅ TENTATIVE BCF-VÆRDIER FRA DATA, DER ER INDSAMLET I UNDERSØGELSEN AF EKSPONERING I FODER

Metoden med eksponering i foder er medtaget i denne forsøgsmetode på grund af bioakkumulerings testen af stoffer, der i praksis ikke kan testes ved hjælp af metoden med eksponering i vand. Metoden med eksponering i vand giver en biokoncentreringsfaktor, mens metoden med eksponering i foder giver direkte oplysninger om fodringsbiomagnificeringspotentialet. Mange kemiske sikkerhedssystemer indeholder krav om biokoncentrering i vand (f.eks. i forbindelse med risikovurdering og det globalt harmoniserede system til klassificering og mærkning af kemikalier). Der er således behov for at anvende data fra en undersøgelse af eksponering i foder til at anslå en biokoncentreringsfaktor, der er sammenlignelig med test, der udføres i henhold til metoden med eksponering i vand ⁽¹⁾. Dette afsnit omhandler metoder hertil, idet det dog erkendes, at der er mangler ved skønnene.

I undersøgelsen af eksponering i foder måles udskillelse for at få en udskillelshastighedskonstant k_2 . Hvis en optagelseshastighedskonstant kan anslås ved hjælp af de tilgængelige data for de tilfælde, hvor fiskene har været udsat for teststoffet i vand, kan man anslå en kinetisk BCF.

Skønnet over en optagelseshastighedskonstant for eksponering for et teststof i vand afhænger af mange antagelser, som alle vil medvirke til at gøre skønnet usikkert. Desuden er denne metode til at anslå en BCF baseret på den antagelse, at den samlede udskillelse (inklusive medvirkende faktorer såsom fordeling i kroppen og individuelle udskillelsesprocesser) er uafhængig af den eksponeringsteknik, der anvendes til at frembringe et teststofs belastning af kroppen.

De væsentligste forudsætninger, som ligger til grund for skønnet, kan sammenfattes som følger:

udskillelse efter indtagelse via føden er den samme som udskillelse efter eksponering for et bestemt stof i vand

optagelse af stoffet fra vand vil følge en førsteordenskinetik.

Afhængigt af den anvendte metode til at anslå optagelse:

- kan optagelse korreleres med fiskenes vægt alene
- kan optagelse korreleres med stoffets octanol-vand-fordelingskoefficient alene
- kan optagelse korreleres med en kombination af fiskenes vægt og stoffets octanol-vand-fordelingskoefficient
- har faktorer, der kan påvirke optagelse i en undersøgelse af eksponering i vand i praksis, såsom et stofs biotilgængelighed, adsorption til apparater, molekylær størrelse osv., kun begrænset effekt
- og mindst lige så vigtigt:

er den database, der bruges til at udvikle metoden til at anslå optagelse, repræsentativ for det pågældende stof.

Flere publikationer i den offentligt tilgængelige litteratur har udledt ligninger for forholdet mellem fisks optagelse fra vand via gællerne og et stofs octanol-vand-fordelingskoefficient, fiskenes vægt (1) (2) (3) (4), mængde og/eller fedtindhold, membrangennemtrængning/-diffusion (5) (6), fiskenes ventilationsvolumen (7) og via en tilgang med fugasitet/massebalance (8) (9) (10). En detaljeret evaluering af sådanne metoder anvendt i denne forbindelse findes i Crookes & Brooke (11). I en publikation af Barber (12) ligger fokus på modellering af bioakkumulering gennem optagelse via foder, og den kan også være nyttig i denne sammenhæng, da den omfatter bidrag fra modeller med optagelse via gæller. En del af baggrundsdokumentet til foderprotokollen fra 2004 (13) behandler også dette aspekt.

⁽¹⁾ I naturen er den rute, der fører til den største eksponering i vandmiljøer, sandsynligvis gennem indtagelse af meget hydrofobe stoffer, og en anslået BCF er derfor ikke 100 % repræsentativ for et sådant stofs bioakkumuleringspotentiale.

De fleste af disse modeller ser ud til at være udledt på baggrund af begrænsede databaser. For modeller, hvor der foreligger oplysninger om den database, der er anvendt som grundlag, ser det ud til, at den anvendte type stoffer ofte er af samme struktur eller klasse (med hensyn til funktionalitet, f.eks. organiske chlorforbindelser). Dette øger usikkerheden ved at bruge en model til at forudsige en optagelseshastighedskonstant for en anden type stof, ud over testspecifikke hensyn såsom art, temperatur osv.

Det fremhæves i en gennemgang af tilgængelige teknikker (11), at ingen metode er »mere korrekt« end andre. Der bør derfor gives en klar begrundelse for valg af model. Hvis der findes flere forskellige metoder, hvis anvendelse kan begrundes, kan det være fornuftigt at fremlægge flere skøn over k_1 (og dermed over BCF) eller en række af k_1 -værdier (og BCF) ifølge flere modeller for skøn over optagelse. I betragtning af forskellene mellem modeltyper og de datasæt, der anvendes til at udvikle dem, vil det ikke være hensigtsmæssigt at tage en gennemsnitsværdi ud fra skøn, der er udledt på forskellige måder.

Nogle forskere har anført, at BCF-skøn af denne type kræver korrigerende for biotilgængelighed for at tage hensyn til et stofs adsorption til opløst organisk kulstof (DOC) i forbindelse med eksponering i vand for at bringe skønnet i overensstemmelse med resultater fra undersøgelser af eksponering i vand (f.eks. (13) (14)). Denne korrigerende er dog ikke nødvendigvis hensigtsmæssig i betragtning af DOC i en undersøgelse af eksponering i vand for et »worst case-skøn« (dvs. forholdet mellem et biotilgængeligt stof og et stof målt i opløsningsmiddel). For stærkt hydrofobe stoffer kan optagelse gennem gællerne begrænses af den passive diffusion i nærheden af gællens overflade; i dette tilfælde kan korrektionen muligvis tilskrives denne virkning og ikke det, der var formålet med den.

Det anbefales at fokusere på metoder, som kræver input, for hvilke der foreligger data for stoffer, der testes i henhold til den her beskrevne undersøgelse af eksponering i foder (dvs. log K_{ow} , fiskenes vægt). Andre metoder, der kræver mere komplekse input, kan anvendes, men bør suppleres med yderligere målinger i testen eller detaljeret viden om teststoffet eller fiskearter, som måske ikke er almindeligt tilgængelig. Desuden kan valg af model påvirkes af valideringsniveauet og anvendelsesområdet (se (11) for en gennemgang og sammenligning af forskellige metoder).

Det skal bemærkes, at det fremkomne skøn over k_1 og den anslåede BCF er usikre og måske bør gøres til genstand for en evidensvægtningssammenligning med de afledte BMF-værdier og stofparametre (f.eks. molekyl størrelse) for at danne et samlet billede af et stofs bioakkumuleringspotentiale. Fortolkning og anvendelse af disse parametre kan afhænge af lovrammerne.

LITTERATUR

- (1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. and Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 25: 1-14.
- (2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. and Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. *Aquat. Toxicol.* 30: 325-341.
- (3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 1963-1992.
- (5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in *Aquatic Toxicology and Environmental Fate*, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304-315.

- (6) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343-2355.
- (7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23: 699-707.
- (8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. and Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 1399-1420.
- (9) Campfens J. and Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. *Environ. Sci. Technol.* 31: 577-583.
- (10) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. *QSAR Comb. Sci.* 22: 337-345.
- (11) Crookes M. and Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, UK.
- (12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 755-777
- (13) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (14) Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in *Handbook of property estimation methods for chemicals*, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA: 189-231.«

17) I del C affattes kapitel C.20 således:

»C.20 Formeringstest for *Daphnia magna*

INDLEDNING

Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline (TG)) 211 (2012). OECD's testvejledning bliver med mellemrum revideret på baggrund af den videnskabelige udvikling. Testvejledning 211 for formeringstest stammer fra retningslinje 202, del II, formeringstest for *Daphnia* sp. (1984). Det var almindelig anerkendt, at data fra test udført i henhold til testvejledning 202 kunne variere. Dette betød, at der blev gjort en stor indsats for at identificere årsagerne til denne variation med henblik på at udarbejde en bedre forsøgsmetode. Testvejledning 211 er baseret på resultaterne af disse undersøgelser, ringtest og valideringsundersøgelser fra 1992 (1), 1994 (2) og 2008 (3).

De vigtigste forskelle mellem første version (TG 202, 1984) og anden version (TG 211, 1998) af testvejledningen for formeringstest er følgende:

— Den anbefalede art til undersøgelser er *Daphnia magna* (stor dafnie).

— Testens varighed er 21 dage.

— I semistatiske test er antallet af dyr til hver testkoncentration blevet reduceret fra mindst 40, fortrinsvis opdelt i fire grupper med 10 dyr, til mindst 10 dyr, der holdes enkeltvis (selv om der kan bruges forskellige modeller til test med gennemstrømning).

- Der er fremsat mere specifikke anbefalinger med hensyn til testmedium og fodring.
- De vigtigste forskelle mellem den anden version af testvejledningen for formeringstest (TG 211, 1998) og denne version er følgende:
- Tillæg 7 er blevet tilføjet for at beskrive procedurer til identifikation af nyfødtes køn, hvis dette kræves. I overensstemmelse med tidligere versioner af denne forsøgsmetode er kønsfordeling et valgfrit endepunkt.
- Responsvariablen antal levende afkom pr. overlevende forældredyr er blevet suppleret med yderligere en responsvariabel for formering af dafnier, dvs. det samlede antal levende afkom ved testens afslutning pr. voksen dafnie ved testens begyndelse, idet utilsigtet dødelighed/dødelighed som følge af fejl blandt forældredyr ikke indgår i analysen. Formålet med den ekstra responsvariabel er at tilpasse denne responsvariabel til andre formeringsforsøgsmetoder vedrørende hvirvelløse dyr. Derudover er det i forbindelse med denne responsvariabel muligt i denne forsøgsmetode at fjerne en fejlkilde, nemlig virkningen af utilsigtet dødelighed/dødelighed ved en fejl blandt forældredyr, hvis en sådan forekommer i eksponeringsperioden.
- Yderligere statistiske retningslinjer for udformning af testdesign og behandling af resultater er medtaget for både ECx- (f.eks. EC10 eller EC50) og NOEC/LOEC-tilgangen.
- Der er indført en grænsetest.

De anvendte definitioner findes i tillæg 1.

PRINCIP FOR TESTEN

Det primære formål med testen er at vurdere kemikaliers indvirkning på *Daphnia magnas* formeringsevne. Unge hundafnier (forældregenerationen), yngre end 24 timer ved testens begyndelse, udsættes for testkemikaliets opløst i vand i en række koncentrationer. Testen varer 21 dage. Ved testens afslutning bedømmes det totale antal levende afkom. Forældregenerationens formeringsevne kan udtrykkes på andre måder (f.eks. antal levende afkom pr. moderdyr pr. dag fra den første dag, hvor afkom blev observeret), men skal rapporteres sammen med det samlede antal levende afkom ved testens afslutning. På grund af den semistatiske tests særlige udformning sammenlignet med andre metoder til test af formering af hvirvelløse dyr er det også muligt at tælle antallet af levende afkom fra hver enkelt forældredyr. I modsætning til andre metoder til test af formering af hvirvelløse dyr betyder dette, at afkom af forældredyr, der dør ved en fejl og/eller utilsigtet i løbet af testperioden, kan udelukkes fra vurderingen af data. Hvis der indtræffer forældredødelighed i eksponerede replikater, bør det overvejes, om dødeligheden følger et koncentration/respons-mønster, f.eks. hvis der er tale om en betydelig regression i respons i forhold til testkemikaliet koncentration med en positiv hældning (en statistisk test som Cochran-Armitage-trend testen kan anvendes hertil). Hvis dødeligheden ikke følger et koncentration/respons-mønster, bør replikater med forældredødelighed udelukkes fra analysen af resultaterne. Hvis dødeligheden følger et koncentration/respons-mønster, bør forældredødeligheden tilskrives en følge af testkemikaliets, og replikaterne bør ikke udelukkes fra analysen. Hvis forældredyret dør under testen, dvs. utilsigtet på grund af forkert behandling eller ved en fejl på grund af en uforklarlig hændelse, der ikke har noget med testkemikaliet virkning at gøre, eller viser sig at være af hankøn, udelukkes replikatet fra analysen (se punkt 51 for flere oplysninger). Testkemikaliet toksiske indvirkning på formeringsevnen er udtrykt som ECx ved at fitte data til en passende model ved ikke-lineær regression for at anslå den koncentration, der ville medføre x % reduktion af formeringsevnen, eller alternativt som NOEC/LOEC-værdien (4). Test-koncentrationerne bør ligge omkring de laveste af de anvendte effekt-koncentrationer (f.eks. EC₁₀), hvilket betyder, at denne værdi er beregnet ved interpolering og ikke ekstrapolering.

Forældregenerationens overlevelse og tiden indtil den første yngel bør også rapporteres. Andre effekter af kemikaliets på parametre såsom vækst (f.eks. længde) og eventuelt den reelle populationsforøgelse kan også undersøges (se punkt 44).

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

Resultater fra test af akut toksicitet (jf. kapitel C.2 i dette bilag: *Daphnia* sp., akut immobilisationstest) udført med *Daphnia magna* kan være nyttig med hensyn til at vælge en passende række testkoncentrationer i formeringstestene. Testkemikaliet vandopløselighed og damptryk skal være kendt, og til kvantitativ bestemmelse af testkemikaliet i prøveopløsningerne skal der foreligge en pålidelig analysemetode med dokumenteret genfindingsgrad og kvantificeringsgrænse.

Data for testkemikaliet, som kan være nyttige for at fastslå testbetingelserne, inkluderer strukturformel, stoffets renhed, lysstabilitet, stabilitet i testforløbet, pKa, P_{ow} og resultater af test for spontan bionedbrydelighed (se kapitel C.4 (bestemmelse af "spontan" bionedbrydelighed) og C.29 (spontan bionedbrydelighed — CO₂ i forseglede beholdere) i dette tillæg).

TESTENS GYLDIGHED

Hvis en test skal være gyldig, skal kontrollen/kontrollerne opfylde følgende resultatkrav:

- Forældregenerationens dødelighed (hundafnier) må ikke overstige 20 % ved testens afslutning.
- Det gennemsnitlige antal levende afkom pr. overlevende forældre-hundafnie ved testens afslutning er ≥ 60 .

Bemærk: Samme validitetskriterium (20 %) kan bruges for utilsigtet dødelighed/dødelighed ved en fejl blandt forældregenerationen til kontrollerne og til hver testkoncentration.

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

Testbeholdere og andet apparatur, der kommer i berøring med testopløsningerne, bør være udført helt i glas eller andet kemisk inaktivt materiale. Testkarrene vil almindeligvis være af glas.

Yderligere nødvendigt apparatur kan være følgende:

- iltmålingsapparat (med mikroelektrode eller andet passende udstyr til måling af opløst ilt i små prøvevolumener)
- egnet apparatur til temperaturregulering
- pH-meter
- apparatur til måling af vands hårdhedsgrad
- apparatur til måling af totalkoncentrationen af organisk kulstof (TOC) i vand eller apparatur til bestemmelse af det kemiske iltbehov (COD)
- passende apparatur til kontrol af lysregime og måling af lysintensitet.

Testorganisme

Den art, der skal benyttes i testen, er *Daphnia magna* Straus ⁽¹⁾.

En genotypebestemmelse som identifikation af arten vil være at foretrække. Undersøgelser 1) har vist, at formeringsevnen af Klon A (som stammer fra IRCHA i Frankrig) (5) er stabil med hensyn til det relevante validitetskriterium med sit gennemsnit på ≥ 60 levende afkom pr. forældredafnie, der overlever ved de dyrkningsbetingelser, som er beskrevet i denne forsøgsmetode. Andre kloner er imidlertid acceptable, hvis det kan påvises, at dafniekulturen opfylder validitetskriterierne for testen.

⁽¹⁾ Andre dafnier kan anvendes, under forudsætning af at de opfylder validitetskriterierne (det relevante validitetskriterium for alle arter er formeringsevnen, som den ses i kontrollerne). Hvis der anvendes andre dafnier, bør de klart defineres og brugen af dem begrundes.

Ved testens begyndelse bør dyrene være yngre end 24 timer og må ikke være det først udrugede afkom. Dyrene bør hidrøre fra en sund bestand (dvs. fri for tegn på stress som høj dødelighed, tilstedeværelse af hanner og ephippia, forsinket frembringelse af første kuld, misfarvede dyr osv.). De dyr, der siden skal levere forsøgsdyr, skal opdrættes under betingelser (lys, temperatur, medium, fodring og antal dyr pr. volumenenhed) svarende til dem, der anvendes i testen. Hvis dafnierne rutinemæssigt lever i et andet medium end det, der anvendes i testen, er det god praksis at inkludere en akklimatiseringsperiode forud for testen på normalt tre uger (dvs. en generation) for at undgå at stresse forældregenerationen.

Testmedium

Det anbefales at anvende et veldefineret medium i denne test. Derved undgås brugen af additiver (f.eks. tang og udtræk af jord), som er vanskeligt at karakterisere, og derved forbedres muligheden for standardisering laboratorierne imellem. Medierne Elendt M4 (6) og M7 (se tillæg 2) er fundet velegnede til dette formål. Andre medier (f.eks. (7) (8)) er imidlertid acceptable, hvis det kan påvises, at dafniekulturen opfylder validitetskriterierne for testen.

Hvis der anvendes medier, som indeholder udefinerede tilsætningsstoffer, skal disse klart specificeres, og der skal fremskaffes oplysninger til testrapporten om sammensætning, særligt med hensyn til kulstofindhold, da det kan optræde som tilskud til foderet. Det anbefales at fastlægge det totale organiske kulstof (TOC) og/eller kemiske iltkrav (COD) til det organiske additiv i stamopløsningen, og at der foretages en vurdering af det medfølgende tilskud til TOC/COD i testmediet. Det anbefales yderligere, at niveauet af TOC i mediet (før tilsætning af alger) er under 2 mg/l (9).

Det er vigtigt at gøre sig klart i forbindelse med undersøgelse af kemikalier, der indeholder metaller, at testmediets egenskaber (f.eks. hårdhed og cheleringskapacitet) kan have indflydelse på testkemikaliets toksicitet. Af den grund er et fuldt ud defineret medium ønskeligt. For tiden er de eneste fuldt ud definerede medier, som er egnede til langtidskulturer med *Daphnia magna*, Elendt M4 og M7. Begge indeholder EDTA som cheleringsmiddel. Det er blevet påvist (2), at cadmiums "tilsyneladende toksicitet" generelt er lavere, når formeringstesten udføres med M4 og M7 end med medier uden EDTA. Af den grund er M4 og M7 ikke at anbefale, når der skal undersøges kemikalier indeholdende metaller, ligesom andre medier, som er kendt for at indeholde chelerende stoffer, ligeledes bør undgås. Til kemikalier, der indeholder metaller, tilrådes brug af andre medier som f.eks. hårdt ferskvand tilsat ASTM (9), som ikke indeholder EDTA. Denne kombination af hårdt ferskvand tilsat ASTM og algeekstrakt (10) er egnet til langsigtet dyrkning af *Daphnia magna* (2).

Koncentrationen af opløst ilt bør være over 3 mg/l i begyndelsen af og under testen. pH-værdien bør ligge mellem 6 og 9 og bør normalt ikke variere mere end 1,5 enheder pr. test. En hårdhed på over 140 mg/l (målt som CaCO₃) anbefales. Test på dette niveau og derover har vist formeringsevne, der er i overensstemmelse med validitetskriterierne (11)(12).

Testopløsninger

Testopløsninger med de valgte koncentrationer fremstilles almindeligvis ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsninger bør fortrinsvis fremstilles, om muligt uden brug af opløsningsmidler eller dispergeringsmidler, ved at blande eller omryste testkemikaliets i testmediet ved mekanisk omrystning, omrøring eller ultralydbehandling. Det er mest hensigtsmæssigt at udsætte testsystemer for de koncentrationer af testkemikaliets, der skal bruges i testen, så længe det er nødvendigt for at dokumentere stabile eksponeringskoncentrationer før indførelsen af testorganismer. Hvis testkemikaliets er vanskeligt at opløse i vand, bør de procedurer, der er beskrevet i OECD's vejledning om håndtering af vanskelige stoffer, følges (13). Anvendelse af opløsningsmidler eller dispergeringsmidler bør undgås, men kan i nogle tilfælde være nødvendig for at fremstille en stamopløsning med en passende koncentration til dosering.

Ud over testkoncentrationerne bør en fortyndingsvandkontrol og, om nødvendigt, en opløsningsmiddelkontrol med passende replikater køres. Kun opløsningsmidler eller dispergeringsmoder, som påviseligt ikke har betydelig eller kun minimal indvirkning på responsvariablen, bør anvendes i testen. Eksempler på egnede opløsningsmidler (f.eks. acetone, ethanol, methanol, dimethylformamid og triethylenglycol) og dispergeringsmidler (f.eks. Cremophor RH40, methylcellulose 0,01 % og HCO-40) findes i (13). Hvis der anvendes et opløsnings- eller dispergeringsmiddel, bør dets slutkoncentration ikke overstige 0,1 ml/l (13), og der bør være samme koncentration i alle testbeholdere, bortset fra ved fortyndingsvandkontrollen. Det bør dog tilstræbes at holde koncentrationen af opløsningsmiddel på et minimum.

FREM GANGSMÅDE

Eksponeringsbetingelser

Varighed

Testen varer 21 dage.

Belastning

Forældredyrene holdes individuelt, et pr. testbeholder, sædvanligvis med 50-100 ml medium (for *Daphnia magna* er mindre mængder en mulighed, især for mindre dafnier såsom *Ceriodaphnia dubia*) i hver beholder, medmindre der er behov for et gennemstrømningstestdesign til testen.

Af hensyn til målinger af koncentrationen af testkemikaliets kan større volumener være nødvendige for at opfylde kravene til analyseproceduren; det er dog tilladt at foretage den kemiske analyse på en pulje af replikater. Hvis der anvendes større mængder end 100 ml, kan det være nødvendigt at øge fødemængden for at sikre, at dafnierne har nok foder, og sikre overensstemmelse med validitetskriterierne.

Forsøgsdyr

Ved semistatistiske test skal der være mindst 10 dyr, hver holdt separat, for hver testkoncentration og mindst 10 dyr, hver holdt separat, i kontrolserien.

Det har ved gennemstrømningstest vist sig passende med 40 dyr opdelt i grupper med 10 dyr for hver testkoncentration (1). Man kan anvende et mindre antal testorganismer, og der anbefales da et minimum på 20 dyr pr. koncentration opdelt i to eller flere replikater med et tilsvarende antal dyr (f.eks. fire replikater med hver fem dafnier). Det skal bemærkes, at ved test, hvor dyrene holdes gruppevis, vil det ikke være muligt at udelukke afkom fra den statistiske analyse, hvis der forekommer utilsigtet dødelighed/dødelighed ved en fejl blandt forældredyrene, efter at formeringen er påbegyndt, og i disse tilfælde bør formeringsevnen derfor udtrykkes som det totale antal levende afkom pr. forældredyr, der er til stede ved testens begyndelse.

Tilsætning til testbeholderne og de efterfølgende håndteringer af dem bør foretages på en randomiseret måde. Hvis dette ikke gøres, risikerer man systematiske fejl, der kan opfattes som en koncentrationsrelateret virkning. Hvis undersøgelsesenheder håndteres efter behandling eller koncentration, kan en vis tidsrelateret virkning, som f.eks. persontræthed eller anden fejlmulighed, få større effekt ved de højere koncentrationer. Hvis testresultaterne desuden kan tænkes at være påvirket af begivenheder ved testens start eller af omgivelserne, som f.eks. beholdernes placering i laboratoriet, bør man overveje at dele testen op i grupper.

Fodring

I semistatistiske test bør fodring foretages dagligt eller mindst tre gange ugentligt (dvs. svarende til udskiftning af medium). Der bør tages hensyn til eventuel fortynding af eksponeringskoncentrationerne på grund af tilsætning af foder. Dette bør i videst muligt omfang undgås ved hjælp af koncentrerede algesuspensioner. Afvigelser fra dette (f. eks. ved gennemstrømningstest) skal rapporteres.

Under testen bør forældredyr fortrinsvis fodres med levende algeceller af en eller flere af følgende: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (tidligere *Selenastrum capricornutum*) og *Desmodesmus subspicatus* (tidligere *Scenedesmus subspicatus*). Det tilførte foder bør baseres på mængden af organisk kulstof (C) for hvert forældredyr. Undersøgelser (14) har vist, at det for *Daphnia magna* er tilstrækkeligt med fodermængder i størrelsesordenen 0,1 til 0,2 mg C/*Daphnia*/døgn for at opnå det krævede antal levende afkom og opfylde validitetskriterierne. Fodermængden kan enten gives med en konstant frekvens gennem hele forsøgsperioden, eller der kan eventuelt gives en lavere mængde til at begynde med, som så efterfølgende kan forøges i løbet af testen for at tage hensyn til forældredyrenes vækst. I så fald bør fodermængden i hele perioden stadig ligge inden for de anbefalede mængder på 0,1 til 0,2 mg C/*Daphnia*/døgn.

Hvis erstatningsmålinger, som f.eks. antal algeceller eller lysabsorption anvendes (for nemheds skyld, da måling af kulstofindhold er tidskrævende), bør hvert laboratorium fremstille et nomogram, som sammenholder erstatningsmålingen med kulstofindholdet i algekulturen (se tillæg 3 for rådgivning om konstruktion af nomogram). Nomogrammer bør kontrolleres mindst en gang årligt og hyppigere, hvis betingelserne for algedyrkningen har ændret sig. Det er påvist, at lysabsorption er en bedre erstatning end celletælling til beregning af kulstofindhold (15).

Man bør tilføre dafnierne algesuspensionen i koncentreret form, således at mindst muligt af algedyrkningsmediet overføres til forsøgskarrene. Opkoncentrering af alger kan foretages ved centrifugering efterfulgt af resuspension i dafniedyrkningsmedium.

Lys

16 timers lys med en intensitet, der ikke overstiger $15\text{--}20 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ målt ved beholderens vandoverflade. For lysmåleinstrumenter kalibreret i lux svarer en tilsvarende lysintensitet på 1 000–1 500 lux med cool white-lys til den anbefalede lysintensitet på $15\text{--}20 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Temperatur

Testmediets temperatur skal ligge på mellem 18 og 22 °C. I det enkelte forsøg bør temperaturen om muligt dog ikke variere mere end 2 °C dagligt (f.eks. 18–20, 19–21 eller 20–22 °C). Det kan være hensigtsmæssigt at anvende en testbeholder mere til brug for overvågning af temperaturen.

Gennemluftning

Testbeholderne må ikke gennemluftes under testen.

Testdesign

Forprøve til bestemmelse af intervaller

Når det er nødvendigt, udføres der en forprøve for at bestemme dosisinterval med f.eks. fem testkemikaliekoncentrationer og to replikater for hver behandling og kontrol. Yderligere oplysninger fra test med lignende kemikalier eller fra litteraturen om akut toksicitet for dafnier og/eller andre organismer, der lever i vand, kan også være nyttige for fastlæggelsen af de koncentrationsintervaller, der skal anvendes til forprøven.

Forprøvens varighed er 21 dage eller tilstrækkelig lang til, at virkninger kan forudsiges pålideligt. Ved testens afslutning vurderes dafniernes reproduktion. Antallet af forældredyr og forekomsten af afkom bør registreres.

Endelig test

Normalt bør der være mindst fem testkoncentrationer omkring effektiv koncentration (f.eks. EC_x) arrangeret i en geometrisk række med en adskillelsesfaktor, som ikke bør overstige 3,2, og der bør bruges et passende antal replikater for hver testkoncentration (se punkt 24-25). Det bør begrundes, hvis der bruges under fem koncentrationer. Kemikalier bør ikke testes i koncentrationer, der overstiger deres opløselighed i testmedium. Før et forsøg anbefales det at overveje testmodellens statistiske power og benytte passende statistiske metoder (4). I fastlæggelsen af koncentrationsintervallet bør følgende tages i betragtning:

- i) Når EC_x for indvirkning på formeringsevnen anslås, er det tilrådeligt at anvende tilstrækkeligt mange koncentrationer til, at EC_x kan defineres med passende sikkerhed. De anvendte testkoncentrationer bør fortrinsvis ligge omkring den anslåede EC_x -værdi, således at EC_x findes ved interpolering og ikke ekstrapolering. Det vil være hensigtsmæssigt med flere testkoncentrationer i den efterfølgende statistiske analyse (f.eks. 10) og færre replikater af hver koncentration (f.eks. 5, således at det samlede antal beholdere holdes konstant) samt 10 kontroller.
- ii) Når LOEC og/eller NOEC anslås, bør den laveste testkoncentration være så lav, at formeringsevnen ved denne koncentration ikke er betydeligt lavere end i kontrollen. Hvis det ikke er tilfældet, bør testen gentages med en mindre laveste koncentration.
- iii) Når LOEC og/eller NOEC anslås, bør den højeste testkoncentration være så høj, at formeringsevnen ved denne koncentration er signifikant lavere end i kontrollen. Hvis dette ikke er tilfældet, bør testen gentages med en højere højeste koncentration, medmindre der er anvendt den maksimale krævede koncentration til test af kroniske virkninger (dvs. 10 mg/l) som højeste testkoncentration i forprøven.

Hvis der ikke observeres virkninger ved den højeste koncentration i forprøven (f.eks. ved 10 mg/l), eller når det er meget sandsynligt, at testkemikallet har lav/ingen toksicitet på basis af manglende toksicitet for andre organismer og/eller ringe eller ingen optagelse, kan formeringstesten gennemføres som en grænsetest, hvor der anvendes en testkoncentration på f.eks. 10 mg/l. Der bruges 10 replikater til både behandlings- og kontrolgruppen. Når det kan blive nødvendigt at foretage en grænsetest i et gennemstrømningssystem, kan antallet af replikater reduceres. Med en grænsetest kan det påvises, at der ikke er nogen statistisk signifikant virkning ved grænsekoncentrationen, men hvis der registreres virkninger, vil det normalt være nødvendigt med en komplet undersøgelse.

Kontroller

Foruden testserien bør der gennemføres en kontrolserie med testmedium og, hvis det er relevant, en kontrolserie med opløsnings- eller dispergeringsmiddel. Hvis der bruges opløsnings- eller dispergeringsmiddel, bør koncentrationen være den samme som koncentrationen i beholderne med testkemikallet. Der bør anvendes et passende antal replikater (se punkt 23-24).

Almindeligvis vil variationskoefficienten for det gennemsnitlige antal afkom pr. forældredyr i kontrollen/kontrollerne i en vellykket test være $\leq 25\%$, og dette skal rapporteres for testdesign, hvor dyrene har været holdt hver for sig.

Fornyelse af testmedium

Hvor ofte mediet fornyes, afhænger af testkemikallets stabilitet, men det bør ske mindst tre gange om ugen. Hvis man fra tidligere stabilitetstest (se punkt 7) ved, at koncentrationen af testkemikallet ikke er stabil (dvs. uden for 80-120 % af den nominelle koncentration eller falder til under 80 % af den målte koncentration i forprøven) i løbet af den maksimale fornyelsesperiode (dvs. tre døgn), bør man overveje at skifte mediet hyppigere eller at gå over til en gennemstrømningstest.

Når mediet fornyes i semistatiske test, gøres en anden række af testkar klar, og forældredyrene flyttes derover, f.eks. ved hjælp af en glaspipette med en passende diameter. Der bør overføres mindst muligt medium sammen med dafnierne.

Observationer

Resultaterne af de observationer, der er foretaget under testen, bør registreres i dataark (se eksempler i tillæg 4 og 5). Hvis der ønskes andre målinger (se punkt 44), kan det være nødvendigt med flere observationer.

Afkom

Det er bedst dagligt at fjerne og tælle afkom fra hvert forældredyr fra første dag, der ses yngel, for at hindre ynglen i at indtage den føde, der er tiltænkt forældredyret. I denne forsøgsmetode tælles kun antal levende afkom, men tilstedeværelsen af aborterede æg eller dødt afkom bør også registreres.

Dødelighed

Dødeligheden blandt forældredyrene bør noteres dagligt og mindst fald lige så ofte, som afkommet tælles.

Andre parametre

Selv om denne forsøgsmetode primært er udformet til at vurdere virkninger på formeringsevnen, kan andre virkninger også kvantificeres i tilstrækkelig grad til, at der kan foretages statistiske beregninger. Det samlede antal afkom pr. overlevende forældredyr, dvs. antal levende afkom fra testen pr. overlevende forældredyr, kan registreres. Dette kan sammenlignes med den vigtigste responsvariabel (antal afkom pr. forældredyr ved testens begyndelse, der ikke ved en fejl eller utilsigtet døde i løbet af testen). Hvis der indtræffer forældredødelighed i eksponerede replikater, bør det overvejes, om dødeligheden følger et koncentration/respons-mønster, f.eks. hvis der er tale om en betydelig regression i respons i forhold til testkemikaliet med en positiv hældning (en statistisk test som Cochran-Armitage-trend testen kan anvendes hertil). Hvis dødeligheden ikke følger et koncentration/respons-mønster, bør replikater med forældredødelighed udelukkes fra analysen af resultaterne. Hvis dødeligheden følger et koncentration/respons-mønster, bør forældredødeligheden tilskrives en følge af testkemikaliet, og replikaterne bør ikke udelukkes fra analysen af testresultaterne. Det er yderst ønskeligt at foretage vækstmålinger, da de giver oplysninger om mulige subletale virkninger, som kan være nyttige som supplement til målinger af reproduktion. Det anbefales at måle forældredyrenes længde (dvs. kropslængden minus den anale spina) ved forsøgets afslutning. Andre parametre kan måles eller beregnes såsom tiden til fremkomst af den første yngel (og efterfølgende yngel), antal under pr. dyr og deres størrelse, antal aborterede afkom, tilstedeværelse af nyfødte handyr (OECD, 2008) eller ephippier og muligvis den egentlige populationsstigning (se tillæg 1 for definition og tillæg 7 for identifikation af nyfødtes køn).

Hyppighed af analyser og målinger

Iltkoncentration, temperatur, hårdhedsgrad og pH-værdier bør som minimum måles hver uge i nye og gamle medier, i kontroller og i opløsninger med den højeste koncentration af testkemikaliet.

Mens forsøget løber, måles koncentrationen af testkemikaliet med regelmæssige intervaller.

I semistatiske test, hvor koncentrationen af testkemikaliet forventes at forblive inden for ± 20 % af den nominelle koncentration (dvs. inden for 80-120 %, se punkt 6 og 7), anbefales det som et minimum at måle højeste og laveste testkoncentration ved fremstillingen og i forbindelse med udskiftning en gang i den første testuge (dvs. at analyser bør udføres på en prøve fra samme opløsning — nyfremstillet og ved udskiftning). Disse målinger bør efterfølgende gentages mindst en gang om ugen.

I forbindelse med test, hvor testkemikaliets koncentration ikke forventes at holde sig inden for $\pm 20\%$ af den nominelle koncentration, er det nødvendigt at analysere alle testkoncentrationer, når de er nyfremstillede og ved udskiftning. I de test, hvor testkemikaliets målte koncentration ved start ikke ligger inden for $\pm 20\%$ af den nominelle koncentration, men hvor der er tilstrækkelig dokumentation for, at koncentrationerne ved start kan gentages og er stabile (dvs. inden for 80-120 % af startkoncentrationerne), kan kemiske målinger i testens anden og tredje uge reduceres til den højeste og den laveste testkoncentration. I alle tilfælde skal testkemikaliets koncentration før udskiftning kun bestemmes for en replikatbeholder for hver testkoncentration.

Anvendes der en gennemstrømningstest, er et analysesystem svarende til det, der er beskrevet for semistatistiske test, hensigtsmæssigt (men i dette tilfælde måles "gamle" opløsninger ikke). I den første uge kan det være tilrådeligt at øge antallet af prøveudtagninger (f.eks. tre hold målinger) for at sikre, at testkoncentrationerne holder sig stabile. I den type test bør gennemstrømningshastigheden for fortyndingsvæske og testkemikalie kontrolleres dagligt.

Hvis det kan konstateres, at koncentrationen af det kemikalie, der skal testes, har været holdt tilfredsstillende inden for $\pm 20\%$ af den nominelle eller målte startkoncentration under hele testen, kan resultaterne baseres på nominelle eller målte startværdier. Hvis afvigelsen fra den nominelle eller målte startkoncentration er større end $\pm 20\%$, bør resultaterne udtrykkes som tidsvægtet gennemsnit (se vejledning om beregning i tillæg 6).

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

Testens formål er at bestemme testkemikaliets virkninger på formeringsevnen. Det totale antal levende afkom pr. forældredyr bør beregnes for hver beholder (dvs. hver replikat). Desuden kan formeringen beregnes på grundlag af levende afkom efter den overlevende forældreorganisme. Men den økologisk mest relevante responsvariabel er det samlede antal levende afkom pr. forældredyr, som ikke dør ved en fejl ⁽¹⁾ eller utilsigtet ⁽²⁾ under testen. Hvis forældredyret dør utilsigtet eller ved en fejl under forsøget eller viser sig at være af hankøn, udelukkes replikaterne fra analysen. Analysen vil så blive baseret på et reduceret antal replikater. Hvis der indtræffer forældredødelighed i eksponerede replikater, bør det overvejes, om dødeligheden følger et koncentration/respons-mønster, f.eks. hvis der er tale om en betydelig regression i respons i forhold til testkemikaliets koncentration med en positiv hældning (en statistisk test som Cochran-Armitage-trend testen kan anvendes hertil). Hvis dødeligheden ikke følger et koncentration/respons-mønster, bør replikater med forældredødelighed udelukkes fra analysen af resultaterne. Hvis dødeligheden følger et koncentration/respons-mønster, bør forældredødeligheden tilskrives en følge af testkemikaliets, og replikaterne bør ikke udelukkes fra analysen af testresultaterne.

Når LOEC og NOEC eller EC_x bruges til at udtrykke virkningerne, anbefales det at beregne virkningen på formering ved hjælp af begge ovennævnte responsvariable, dvs.

- som det samlede antal levende afkom pr. forældredyr, der ikke dør utilsigtet eller ved en fejl under testen, og
- som antal levende afkom pr. overlevende forældredyr,

og derefter som det endelige resultat bruge den laveste NOEC- og LOEC- eller EC_x-værdi, der beregnes ved hjælp af en af disse to responsvariable.

Før den statistiske analyse anvendes, f.eks. ANOVA-procedurer, sammenholdelse af behandlinger og kontroller ved hjælp af Student t-test, Dunnetts test, Williams' test eller stepdown Jonckheere-Terpstra test, anbefales det at overveje at transformere data for at opfylde kravene i den pågældende statistiske test. Som ikke-parametriske alternativer kan Dunns eller Mann-Whitneys test overvejes. Der beregnes 95 % konfidensintervaller for de enkelte behandlings middelværdier.

⁽¹⁾ Dødelighed ved en fejl: ikke kemikalierelevanter dødelighed forårsaget af en utilsigtet hændelse (dvs. kendt årsag).

⁽²⁾ Utilsigtet dødelighed: ikke kemikalierelevanter dødelighed uden kendt årsag.

Antallet af overlevende hunner i de ubehandlede kontroller er et validitetskriterium og bør dokumenteres og rapporteres. Andre skadelige virkninger, f.eks. unormal adfærd og betydelige toksikologiske resultater, bør også anføres i den endelige rapport.

ECx

ECx-værdier, herunder de dermed associerede øvre og nedre konfidensgrænser, beregnes med passende statistiske metoder (f.eks. logistisk funktion eller Weibull-funktion, Trimmed Spearman-Kärber-metoden eller simpel interpolering). For at beregne EC10, EC₅₀ eller enhver anden ECx-værdi underkastes det komplette datasæt en regressionsanalyse.

NOEC/LOEC

Hvis en statistisk analyse skal bruges til at bestemme NOEC/LOEC, bør der anvendes passende statistiske metoder i overensstemmelse med OECD Document 54, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application(4). Generelt undersøges negative virkninger af testkemikaliet sammenlignet med kontrollerne ved hjælp af en ensidet hypotesetest ved $p \leq 0,05$.

Normalfordeling og varianshomogenitet kan testes ved hjælp af en passende statistisk test, f.eks. Shapiro-Wilk og Levene test ($p \leq 0,05$). Der kan foretages en envejs-ANOVA-test og efterfølgende multirisammenligningstest. Multirisammenligninger (f.eks. Dunnetts test) eller step-down trend test (f.eks. Williams' test eller en step-down Jonckheere-Terpstra-test) kan benyttes til at beregne, om der er signifikante forskelle ($p \leq 0,05$) mellem kontrollerne og de forskellige testkemikaliekoncentrationer (valg af den anbefalede test ifølge OECD Guidance Document 54 (4)). Alternativt kan ikke-parametriske metoder (f.eks. Bonferroni-U-test ifølge Holm eller Jonckheere-Terpstras trend test) benyttes til at fastslå NOEC og LOEC.

Grænsetest

Er der udført en grænsetest (sammenligning af kontrol og kun en behandlingsprøve), og forudsætningerne for parametriske testprocedurer (normalitet og homogenitet) er opfyldt, kan metrisk respons vurderes ved Student-testen (t-test). En t-test med ulige varians (Welch t-test) eller en ikke-parametrisk test, f.eks. Mann-Whitney-U-testen, kan bruges, hvis disse krav ikke er opfyldt.

For at fastslå, om der er signifikante forskelle mellem kontrollerne (kontrol og opløsningsmiddel-/dispergeringsmiddelkontrol), kan replikaterne af hver kontrol testes som beskrevet for grænsetesten. Hvis disse test ikke viser signifikante forskelle, kan alle replikater af kontrol og opløsningsmiddelkontrol pooles. I modsat fald bør alle behandlinger sammenlignes med opløsningsmiddelkontrollen.

Testrapport

Testrapporten indeholder følgende:

Testkemikalie:

- fysisk beskaffenhed og relevante fysisk-kemiske egenskaber
- kemiske identifikationsdata, herunder renhed.

Testart:

- klonen (om den er genotypebestemt), leverandør eller kilde (hvis kendt) og de anvendte dyrkningsbetingelser. Hvis en anden art end *Daphnia magna* anvendes, anføres og begrundes dette.

Testbetingelser:

- den anvendte testprocedure (f.eks. semistatisk eller gennemstrømning, volumen, antal dafnier pr. liter)

- lysperiode og lysintensitet
- testdesign (f.eks. antal replikater, antal forældredyr pr. replikat)
- oplysninger om anvendt dyrkningsmedium
- eventuel tilsætning af organisk materiale, herunder sammensætning, kilde, fremstillingsmetode, stamopløsnings TOC/COD, vurdering af resulterende TOC/COD i testmediet
- detaljeret information om fodring, herunder mængde (i mg C/dafnie/døgn) og plan (f.eks. fodertype(r)), herunder algerne specifikke navn (art) og, hvis kendt, stamme og dyrkningsbetingelser
- metode til fremstilling af stamopløsninger og hyppighed af fornyelse (evt. opløsningsmiddel eller dispergeringsmiddel og koncentration heraf bør opgives).

Resultater:

- resultater fra eventuelle forprøver vedrørende testkemikaliets stabilitet
- de nominelle testkoncentrationer og resultatet af alle analyser til bestemmelse af koncentrationen af testkemikaliets i testbeholderne (se eksempel på dataark i tillæg 5); metodens genfindingsgrad og kvantificeringsgrænsen bør også rapporteres
- kvaliteten af vandet i testbeholderne (dvs. pH, temperatur, koncentration af opløst ilt og TOC og/eller COD samt hårdhedsgrad, hvor dette er relevant) (se eksempler på dataark i tillæg 4)
- komplet fortegnelse over levende afkom under testen efter hvert forældredyr (se eksempler på dataark i tillæg 4)
- antal døde forældredyr og dagen for hændelsen (se eksempler på dataark i tillæg 4)
- variationskoefficienten for kontrol af formeringsevne (baseret på det totale antal afkom pr. forældredyr, som er i live ved testens afslutning)
- det samlede antal levende afkom pr. forældredyr i hvert replikat bortset fra forældredyr, som kan være døde ved utilsigtet hændelse eller fejl i løbet af testen, plottet mod teststoffets koncentration
- hvor det er relevant, det samlede antal levende afkom pr. levende forældredyr i hvert replikat plottet mod testkemikaliets koncentration
- hvor det er relevant, den laveste koncentration med observeret virkning (LOEC) med hensyn til formering, herunder en beskrivelse af de anvendte statistiske fremgangsmåder og en angivelse af, hvilken størrelse effekt der kan forventes påvist (der kan foretages en poweranalyse før forsøgets start) og koncentrationen uden observeret virkning (NOEC) med hensyn til formering; oplysninger om hvilken responsvariabel, der er anvendt til beregning af LOEC- og NOEC-værdien (enten som samlet antal levende afkom pr. moderorganisme, der ikke er død utilsigtet eller ved en fejl under forsøget, eller som det samlede antal levende afkom pr. overlevende moderorganisme); hvor det er relevant, rapporteres LOEC eller NOEC også for forældredyrenes dødelighed.
- hvor det er relevant, EC_x for formering og konfidensintervaller (f.eks. 90 eller 95 %) og en graf over den model, der er anvendt til beregningen, hældningen på koncentration/respons-kurven og standardfejlen
- andre observerede biologiske virkninger eller målinger. Der anføres enhver biologisk virkning, som er observeret eller målt (f.eks. forældredyrenes vækst), herunder relevante begrundelser
- en redegørelse for enhver afvigelse fra forsøgsmetoden.

LITTERATUR

- (1) OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993.
 - (2) OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.6. OECD, Paris.
 - (3) OECD (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No.88. OECD, Paris.
 - (4) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OECD, Paris.
 - (5) Baird, D.J., *et al.* (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotox. and Environ. Safety*, 21, 257-265.
 - (6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.
 - (7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods
 - (8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, 775-782.
 - (9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. I: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 — 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA
 - (10) Baird, D.J., *et al.* (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. I: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.
 - (11) Parkhurst, B.R., J.L. Forte. And G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.*, 26: 1-8.
 - (12) Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. *Arch. Hydrobiol.*, 120(2): 185-196.
 - (13) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Paris.
 - (14) Sims, I.R., S. Watson. and D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 12, 2053-2058.
 - (15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. *Arch. Hydrobiol.*, 128, 459-466.
-

Tillæg 1

DEFINITIONER

I forbindelse med denne forsøgsmetode anvendes følgende definitioner:

Dødelighed ved en fejl: Ikke kemikalierelateret dødelighed forårsaget af en utilsigtet hændelse (dvs. kendt årsag).

Kemikalie: Et stof eller en blanding.

EC_x: Den koncentration af testkemikaliet opløst i vand, som resulterer i en x procent reduktion i formeringsevne for *Daphnia magna* inden for en fastlagt eksponeringstid.

Utilsigtet dødelighed: Ikke kemikalierelateret dødelighed uden kendt årsag.

Reel populationsforøgelse: Mål for vækst, der integrerer formeringsevne og aldersbetinget dødelighed (1)(2)(3). I en ligevægtspopulation vil den være lig nul. For populationer i vækst vil den være positiv, og for populationer i nedgang vil den være negativ. Det er klart, at den sidste situation er uholdbar og vil ende med populationens udslættelse.

Detektionsgrænse: Den laveste koncentration, der observeres, men som ikke kan kvantificeres.

Bestemmelsesgrænse: Den laveste koncentration, der kan måles kvantitativt.

Laveste koncentration med observeret effekt (LOEC): Den laveste kemikaliekoncentration, der i testen har vist sig at have en statistisk signifikant indflydelse ($p < 0,05$) på formering og forældredyrs dødelighed inden for den fastlagte eksponeringstid, sammenlignet med kontrollen. Imidlertid burde alle undersøgte koncentrationer, der ligger over LOEC, have en skadelig virkning, som er større end eller lig med den, som er observeret ved LOEC. Er disse to betingelser ikke opfyldt, bør der på en fyldestgørende måde redegøres for, hvordan den pågældende LOEC (og dermed NOEC) er valgt.

Dødelighed: Et dyr registreres som dødt, når det ikke bevæger sig, dvs. når det ikke er i stand til at svømme, eller hvis der ikke ses bevægelser af vedhæng eller postabdomen inden for 15 sekunder efter forsigtig omrystning af testbeholderen. (Benyttes en anden definition, bør dette angives tillige med den tilhørende henvisning).

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

Afkom: Unge dafnier, der er født af forældredyr under testen.

Forældredyr: Hundafnier, som er til stede ved testens begyndelse, og hvis formeringsevne er genstand for undersøgelse.

Formeringsevne: Antal levende afkom pr. forældredyr inden for testperioden.

Testkemikalie: Et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

LITTERATUR

- (1) Wilson, E.O. and Bossert, W.H. (1997). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.
- (2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.
- (3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

Tillæg 2

KOMPLET FREMSTILLING AF MEDIERNE ELENDET M7 OG M4

Akklimatisering til medierne Elendt M7 og M4

Nogle laboratorier har haft problemer med at overflytte dafnier direkte til M4- (1) og M7-mediet. Dog har der været en vis succes med gradvis akklimatisering, dvs. flytning fra eget medium til 30 % Elendt efterfulgt af 60 % Elendt og derefter 100 % Elendt. En akklimatiseringsperiode på helt op til en måned kan være nødvendig.

Fremstilling

Sporstoffer

Først fremstilles separate stamopløsninger (I) af hvert mikronæringsstof i vand af passende renhed, f.eks. deioniseret eller destilleret vand eller vand behandlet ved omvendt osmose. Af disse forskellige stamopløsninger fremstilles I) en enkelt stamopløsning II) indeholdende alle mikronæringsstoffer (kombineret opløsning), dvs.:

Stamopløsning(er) I (et enkelt stof)	Mængde tilsat til vand	Koncentration (i forhold til M4- medium)	Til fremstilling af den kombinerede stam- opløsning II tilsættes følgende mængde stamopløsning I til vand	
			ml/l	
	mg/l		M4	M7
H ₃ BO ₃	57 190	20 000-fold	1,0	0,25
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	7 210	20 000-fold	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-fold	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000-fold	1,0	0,25
SrCl ₂ · 6 H ₂ O	3 040	20 000-fold	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-fold	1,0	0,25
Mo Na ₂ O ₄ · 2 H ₂ O	1 260	20 000-fold	1,0	0,25
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	335	20 000-fold	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000-fold	1,0	1,0
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	200	20 000-fold	1,0	1,0
KI	65	20 000-fold	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000-fold	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000-fold	1,0	1,0
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	5 000	2 000-fold	—	—
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	1 991	2 000-fold	—	—

De to opløsninger af Na₂EDTA og FeSO₄ fremstilles hver for sig, hældes sammen og autoklaveres straks. Derved fås:

Fe-EDTA-opløsning		1 000-fold	20,0	5,0

M4- og M7-medium

M4- og M7-medierne fremstilles af stamopløsning II, makronæringsstoffer og vitaminer på følgende måde:

	Mængde tilsat til vand	Koncentration (i forhold til M4-medium)	Mængde stamopløsning tilsat til fremstilling af mediet	
	mg/l		ml/l	
			M4	M7
Stamopløsning II (kombinerede sporstoffer)		20-fold	50	50
Stamopløsninger af makronæringsstoffer (enkelt stof)				
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	293 800	1 000-fold	1,0	1,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	246 600	2 000-fold	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-fold	0,1	0,1
NaHCO_3	64 800	1 000-fold	1,0	1,0
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$	50 000	5 000-fold	0,2	0,2
NaNO_3	2 740	10 000-fold	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000-fold	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-fold	0,1	0,1
Kombineret vitamin-stamopløsning	-	10 000-fold	0,1	0,1

Den kombinerede vitamin-stamopløsning fremstilles ved tilsætning af de tre vitaminer til 1 liter vand som vist nedenfor:

	mg/l			
Thiaminhydrochlorid	750	10 000-fold		
Cyanocobalamin (B_{12})	10	10 000-fold		
Biotin	7,5	10 000-fold		

Den kombinerede vitamin-stamopløsning opbevares nedfrosset i små alikvoter. Vitaminerne tilsættes mediet kort før brug.

Bemærk: For at undgå udfældning af salte, når det fuldstændige medium fremstilles, tilsættes de enkelte opløsninger til 500-800 ml deioniseret vand, hvorefter der ihældes op til 1 liter.

Bemærk: Den første publicerede beskrivelse af M4-mediet kan findes i Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-

Tillæg 3

ANALYSE AF DET TOTALE ORGANISKE KULSTOF (TOC) OG FREMSTILLING AF NOMOGRAM TIL TOC-INDHOLDET I ALGEFODERET

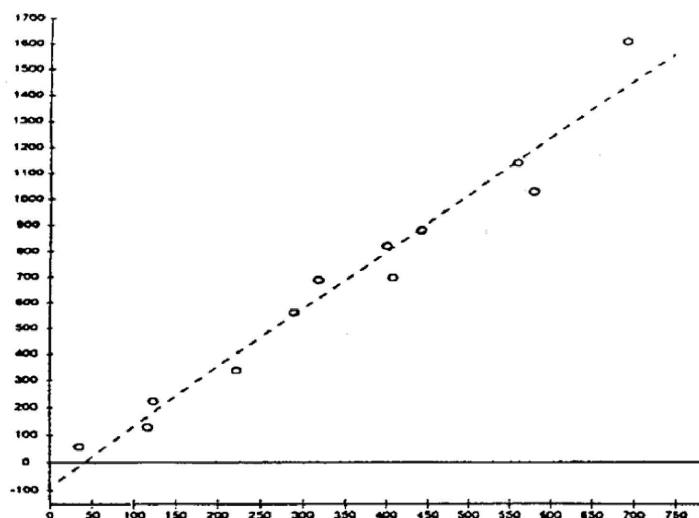
Det erkendes, at kulstofindholdet i algefoderet almindeligvis ikke vil blive målt direkte, men ud fra korrelationer (dvs. nomogrammer med erstatningsmålinger, såsom antallet af algeceller eller lysabsorbans).

TOC bør måles ved oxidering ved høje temperaturer og ikke ved UV- eller persulfatmetoder. (Uddybende oplysninger findes i: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Med henblik på fremstilling af nomogrammer separeres algerne fra dyrkningsmediet ved centrifugering med efterfølgende resuspension i destilleret vand. Erstatningsparameteren og TOC-koncentrationen måles i hver prøve som en tredobbelt bestemmelse. Blindværdier måles i destilleret vand, og TOC-koncentrationen trækkes fra TOC-værdien i algeprøven.

Nomogrammerne skal være lineære i hele området over kulkoncentrationer. Eksempler ses nedenfor:

Bemærk: Disse bør ikke bruges til konvertering; det er essentielt, at laboratorierne selv fremstiller deres egne nomogrammer.



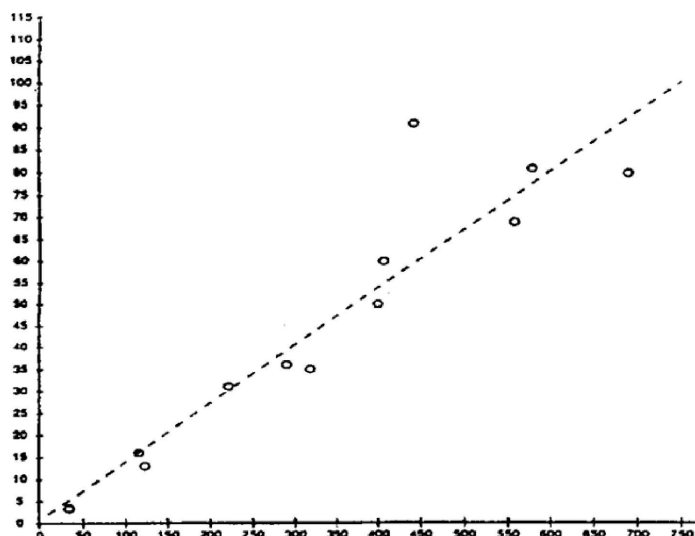
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regression af mg/l tørvægt på mg C/l. Data fra koncentrerede suspensioner af semikontinuerligt dyrkede celler, der genopslæmmes i destilleret vand.

x-akse: mg C/l af koncentreret algefoder

y-akse: mg/l tørvægt af koncentreret algefoder

Korrektionskoefficient -0,980



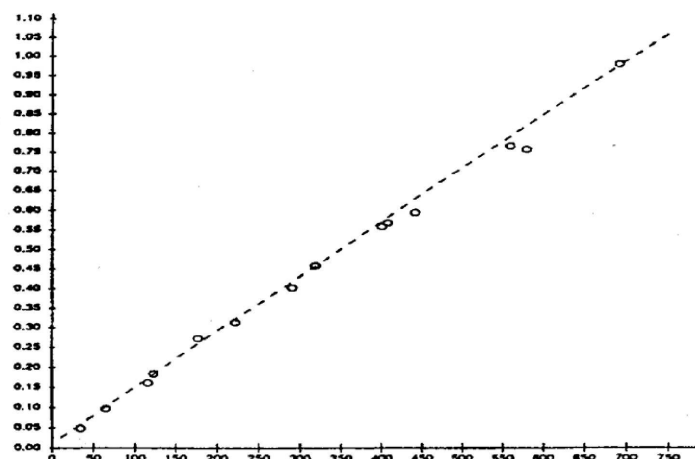
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regression af celleantal på mg C/l. Data fra koncentrerede suspensioner af semikontinuerligt dyrkede celler, der genopslættes i destilleret vand.

x-akse: mg C/l af koncentreret algefoder

y-akse: antal celler/l af koncentreret algefoder

korrektionskoefficient -0,926



Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regression af absorbans på mg C/l (1 cm stilængde). Data fra koncentrerede suspensioner af semikontinuerligt dyrkede celler, der genopslættes i destilleret vand.

x-akse: mg C/l af koncentreret algefoder

y-akse: Absorbansen ved 440 nm af en 1/10-fortynding af koncentreret algefoder

Korrektionskoefficient - 0,998

Tillæg 4

EKSEMPEL PÅ DATAARK TIL NOTATER OM UDSKIFTNING AF MEDIUM, FYSISK/KEMISK MONITORERING, FODRING, FORMERING OG DØDELIGHED BLANDT FORÆLDREDYR

Forsøg nr.:	Startdato:					Klon:			Medium:				Type foder:				Testkemikalie:						Nominel konc.:	
Dag	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Udskiftning af testmedium (sæt kryds)																								
pH (*)																							ny	
																							gammel	
O ₂ (mg/l) (*)																							ny	
																							gammel	
Temp. (°C) (*)																							ny	
																							gammel	
Foder (sæt kryds)																								
Antal levende afkom (**)																								I alt
Beholder 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							I alt	
Kumulativ dødelighed for forældredyr (***)																								

(*) Angiv, hvilken beholder der er anvendt til forsøget

(**) Registrer aborteret yngel som 'AB' i den relevante rubrik

(***) Registrer forældredyrs dødelighed som 'M' i den relevante rubrik

Tillæg 5

EKSEMPEL PÅ DATAARK MED RESULTATER AF KEMISKE ANALYSER

a) **Målte koncentrationer**

[illegible]

b) Målte koncentrationer i procent af nominal konc.

[illegible]

Tillæg 6

BEREGNING AF TIDSVÆGTET GENNEMSNIT

Tidsvægtet gennemsnit

Da koncentrationen af testkemikaliet kan falde i perioden mellem udskiftningerne af mediet, er det nødvendigt at overveje, hvilken koncentration der skal vælges som repræsentant for variationen af koncentrationer, som den voksne dafnie bliver udsat for. Valget bør baseres på såvel biologiske som statistiske betragtninger. Hvis formeringen for eksempel formodes mest påvirket af den højeste koncentration, anvendes denne. Hvis den akkumulerede virkning eller langtidsvirkningen af det toksiske kemikalie imidlertid anses for mere vigtig, er gennemsnitskoncentrationen mere relevant. I dette tilfælde er det hensigtsmæssigt at anvende den tidsvægtede gennemsnitskoncentration, eftersom der her er taget hensyn til variationen i baggrundskoncentration over tid.

Figur 1

Eksempel på tidsvægtet gennemsnit

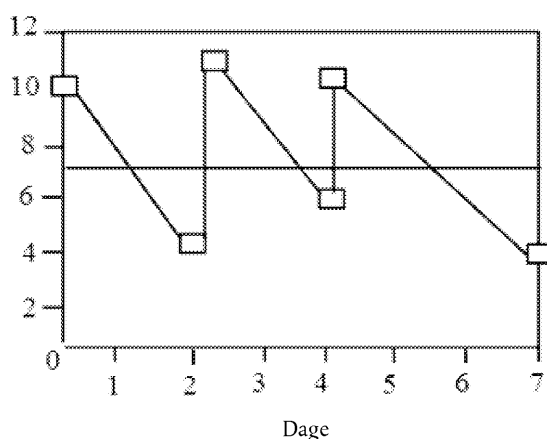


Fig. 1 viser et eksempel på et (forenklet) forsøg over syv dage med udskiftning af mediet på dag 0, 2 og 4.

- Den tynde zigzaglinje repræsenterer koncentrationen på ethvert tidspunkt. Faldet i koncentration formodes at følge en eksponential henfaldsproces.
- De seks angivne punkter repræsenterer de målte koncentrationer ved begyndelsen og slutningen af hver udskiftningsperiode.
- Den tykke, solide linje angiver placeringen af det tidsvægtede gennemsnit.

Det tidsvægtede gennemsnit er beregnet, så arealet under det tidsvægtede gennemsnit har samme størrelse som arealet under koncentrationskurven. Beregningen af det ovenfor viste eksempel ses i tabel 1.

Tabel 1

Beregning af tidsvægtet gennemsnit

Udskiftning Antal	Dage	Conc 0	Conc 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Areal
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544

Udskiftning Antal	Dage	Conc 0	Conc 0	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Areal
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Antal dage i alt		7			Areal i alt:	50,092
					Tidsvægtet gennemsnit:	7,156

Dage er antallet af dage i udskiftningsperioden.

Conc 0 er den målte koncentration ved begyndelsen af hver udskiftningsperiode.

Conc 1 er den målte koncentration ved slutningen af hver udskiftningsperiode.

Ln(Conc 0) er den naturlige logaritme til *Conc 0*.

Ln(Conc 1) er den naturlige logaritme til *Conc 1*.

*Areal*et er arealet under eksponentialkurven for hver udskiftningsperiode. Det beregnes således:

$$Areal = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times Dag$$

Det tidsvægtede gennemsnit er det *totale areal* divideret med det *totale antal dage*.

Tabellen vil selvfølgelig skulle forlænges til 21 dage i forbindelse med dafnie-formeringstesten.

Det er klart, at når der kun foretages målinger ved begyndelsen og slutningen af hver udskiftningsperiode, kan man ikke bekræfte, at henfaldsprocessen er eksponentiel. En anderledes kurve ville resultere i en anderledes beregning for *arealet*. En eksponential henfaldsproces er dog ikke usandsynlig, og det er den bedste kurve at anvende, når der ikke foreligger andre oplysninger.

Der må dog udvises stor omhu, hvis en kemisk analyse ikke kan påvise et testkemikalie ved afslutningen af udskiftningsperioden. Medmindre man kan påvise, med hvilken hastighed testkemikaliet forsvandt fra opløsningen, er det ikke muligt at finde frem til et realistisk areal under kurven, hvilket medfører, at det er umuligt at finde frem til et rimeligt tidsvægtet gennemsnit.

Tillæg 7

VEJLEDNING TIL IDENTIFIKATION AF NYFØDTES KØN

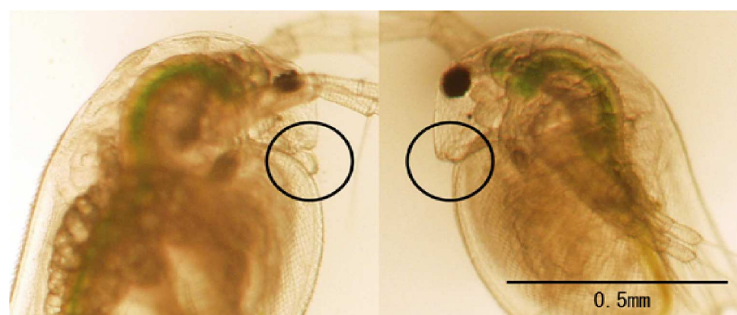
Produktion af nyfødte hanner kan forekomme under skiftende miljøforhold, f.eks. ved forkortet lysperiode, temperaturændring, faldende foderkoncentration og øget populationstæthed (Hobaek og Larson, 1990, Kleiven et al. 1992). Produktion af hanner er også en kendt respons på visse midler til regulering af insektvækst (Oda et al., 2005). Under forhold, hvor kemiske stressfaktorer medfører en nedgang i antallet af formeringsdygtigt afkom fra parthenogenetiske hunner, ville man forvente et stigende antal hanner (OECD, 2008). På grundlag af de foreliggende oplysninger er det ikke muligt at forudsige, hvad der er mest følsomt, kønsfordelingen eller reproduktionsendepunktet. Der er dog indikationer (se del 1 i valideringsrapporten) for, at denne stigning i antallet af hanner kan være mindre følsom end nedgangen i afkom. Da det primære formål med forsøgsmetoden er at vurdere antallet af afkom, er forekomsten af hanner en valgfri observation. Hvis dette valgfri endepunkt evalueres i en undersøgelse, bør et supplerende validitetskriterium i testen være højst 5 % hanner.

Den mest praktiske og letteste måde at inddele dafnierne efter køn på er at bruge deres fænotypiske egenskaber, da hanner og hunner er genetisk identiske og deres køn miljømæssigt bestemt. Hanner og hunner er forskellige, hvad angår de første antenners længde og morfologi, idet hannernes antenner er længere end hunnernes (fig. 1). Denne forskel kan observeres umiddelbart efter fødslen, selv om andre sekundære køns karakteristika udvikler sig i takt med deres vækst (se f.eks. fig. 2 i Olmstead and LeBlanc, 2000).

For at kunne observere det morfologiske køn bør nyfødte af hvert enkelt forsøgsdyr overføres med pipette og anbringes i en petriskål med testmedium. Mediet holdes på et minimum for at begrænse dyrenes bevægelsesfrihed. De første antenner kan observeres under et stereomikroskop ($\times 10$ -60).

Fig. 1

24 timer gammel han (til venstre) og hun (til højre) af *D. magna*. Hanner kan skelnes fra hunner ved de første antenners længde og morfologi som vist i cirklerne (Tatarazako et al., 2004).



REFERENCER

Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197-206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168-1174.

OECD, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, Number 88. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 19:2107-2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Environmental Science 17, 439-449.«

(18) I del C affattes kapitel C.29, punkt 66 som følger:

»66. En test anses for gyldig, hvis:

- a) den gennemsnitlige procentvise nedbrydning i F_C -beholdere, som indeholder referencekemikaliets, er $> 60 \%$ på den 14. inkubationsdag, og
- b) den gennemsnitlige mængde af TIC i blindkontrollerne F_B ved slutningen af testen er $< 3 \text{ mg C/l}$.

Hvis disse grænser ikke overholdes, gentages testen med et inokulum fra en anden kilde, og/eller de anvendte fremgangsmåder kontrolleres. Hvis f.eks. en høj blindproduktion af uorganisk kulstof er et problem, følges fremgangsmåden i afsnit 27-32.«

19) I del C indsættes følgende kapitler:

»C.47 Toksicitetstest med fisk i de tidlige udviklingsstadier

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (TG) 210 (2013). Test med fisk i de tidlige udviklingsstadier har til formål at bestemme kemikaliers letale og subletale virkninger på de testede stadier og arter. De giver nyttige oplysninger til estimering af kemikaliet's kroniske letale og subletale virkninger på andre fiskearter.
2. Testvejledning 210 er baseret på et forslag fra Det Forenede Kongerige, som blev drøftet på et møde med deltagelse af OECD-eksperter i Medmenham (Det Forenede Kongerige) i november 1988, og blev opdateret i 2013 for at afspejle erfaringerne med brug af testen og anbefalinger fra en OECD-workshop om toksicitetstest med fisk, som blev afholdt i september 2010 (1).

PRINCIP FOR TESTEN

3. Fisk i de tidlige udviklingsstadier udsættes for en række koncentrationer af testkemikaliets opløst i vand. Gennemstrømningsbetingelser foretrækkes, men hvis det ikke kan lade sig gøre, er semistatiske betingelser acceptable. Nærmere oplysninger findes i OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (2). Testen indledes ved at anbringe befrugtede æg i testkamre og fortsættes i det artsspecifikke tidsrum, der er nødvendigt for, at kontrolfiskene når yngelstadiet. Letale og subletale virkninger måles og sammenlignes med kontrolværdierne for at bestemme den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) med henblik på at bestemme i) koncentrationen uden observeret effekt (NOEC) og/eller ii) ECx (f.eks. EC10, EC20) ved hjælp af en regressionsmodel for at beregne den koncentration, som ville forårsage en ændring i den målte virkning på $x \%$. Rapporteringen af relevante effektkoncentrationer og parametre kan afhænge af de lovgivningsmæssige rammer. ECx skal ligge i det område, testkoncentrationerne dækker, således at ECx opnås ved interpolering og ikke ved ekstrapolering (definitioner er anført i tillæg 1).

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

4. Ved testkemikaliets forstås det kemikalie, der testes. Testkemikaliet's vandopløselighed (se kapitel A.6 i dette bilag) og damptryk (se kapitel A.4 i dette bilag) bør være kendt, og der bør foreligge en pålidelig analysemetode til kvantificering af kemikaliets i testopløsningerne med kendt og publiceret nøjagtighed og nedre målegrænse. Selv om det ikke er nødvendigt for at gennemføre testen, kan resultater fra en akut toksicitetstest (se kapitel C.1 eller C.49 i dette bilag), fortrinsvis udført på den art, der er valgt til denne test, give nyttige oplysninger.

5. Hvis forsøgsmetoden anvendes til at teste en blanding, skal der så vidt muligt foreligge oplysninger om dens sammensætning, f.eks. i form af bestanddelenes kemiske identitet, deres kvantitative forekomst og deres stofspecifikke egenskaber (som de ovenfor nævnte). Før brug af forsøgsmetoden til lovmæssig test af en blanding bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til det lovgivningsmæssige anvendelsesformål.
6. Nyttige oplysninger omfatter strukturformlen, stoffets renhed, vandopløselighed, vand- og lysstabilitet, pK_a , P_{ow} samt resultater fra en test for umiddelbar biologisk nedbrydelighed (f.eks. kapitel C.4 eller C.29 i dette bilag).

TESTENS GYLDIGHED

7. Følgende betingelser skal være til stede, for at testen betragtes som gyldig:
 - koncentrationen af opløst oxygen skal være $> 60\%$ af værdien for mætning med luft i hele testperioden
 - vandtemperaturen må ikke variere mere end $\pm 1,5\text{ °C}$ imellem testkamrene eller fra dag til dag på noget tidspunkt i testen, og den skal ligge i det temperaturområde, som gælder for den anvendte art (tillæg 2)
 - der skal foretages en analytisk måling af testkoncentrationerne
 - den generelle overlevelse af befrugtede æg og succesen efter klækning i kontrollerne og, hvor relevant, i opløsningsmiddelkontrollerne skal være større end eller lig med de i tillæg 2 fastsatte grænseværdier.
8. Hvis der konstateres en mindre afvigelse fra validitetskriterierne, bør konsekvenserne holdes op imod testdataenes pålidelighed, og disse overvejelser bør fremgå af rapporten. Virkningerne på overlevelse, klækning eller vækst i opløsningsmiddelkontrollen, sammenlignet med den negative kontrol, bør rapporteres og drøftes i forbindelse med testdataenes pålidelighed.

BESKRIVELSE AF METODEN

Testkamre

9. Enhver type glas, rustfrit stål eller andet inaktivt materiale kan anvendes. Eftersom silikone er kendt for en høj evne til absorbering af lipofile stoffer, bør brug af silikonerør i gennemstrømningsforsøg og brug af silikonelåg ved kontakt med vand minimeres, f.eks. ved brug af monoblokglasakvarier. Forsøgsbeholderne bør være store nok til at tillade tilstrækkelig vækst i kontrollen, opretholde koncentrationen af opløst oxygen (f.eks. vil et tankvolumen på 7 l være tilstrækkelig til små fiskearter) og opfylde de kriterier for belastningsgrad, der er anført i punkt 19. Testkamrene bør anbringes randomiseret i testområdet. Et randomiseret blok-design, hvor samme behandling forefindes i hver blok, bør foretrækkes frem for et helt randomiseret design. Testkamrene bør skånes for unødvendige forstyrrelser. Testsystemet bør konditioneres med koncentrationer af testkemikallet i et tilstrækkeligt tidsrum til at udvise stabile eksponeringskoncentrationer forud for tilsætningen af testorganismer.

Valg af fiskeart

10. Anbefalede fiskearter fremgår af tabel 1. Der kan anvendes andre arter, men forsøgsmetoden må i så fald tilpasses, så testbetingelserne bliver passende. Der skal da anføres en begrundelse for valg af art og forsøgsmetode.

Opbevaring af fisk til yngel

11. Detaljer vedrørende pasning af fisk til yngel under tilfredsstillende forhold kan findes i tillæg 3 og i de angivne kilder i henvisning (3)(4)(5).

Håndtering af befrugtede æg, embryoner og larver

12. Befrugtede æg, embryoner og larver kan i første omgang eksponeres i hovedbeholderen i mindre beholdere af glas eller rustfrit stål, som er forsynet med netsider eller -ender, således at testopløsningen kan strømme gennem beholderen. Man kan bevirke et ikke-turbulent flow gennem de mindre beholdere ved at lade dem hænge ned fra en arm, som bevæger beholderne op og ned, dog altid med organismerne under overfladen. Befrugtede lakseæg kan anbringes på stativer eller net med masker tilstrækkeligt store til at lade larverne falde igennem efter udklækning.
13. I de tilfælde, hvor man har anvendt beholdere, riste eller netværk til at holde æg inde i testbeholderen, skal disse fjernes, når æggene klækkes, jf. vejledningen i tillæg 3, idet man dog beholder det netværk, som hindrer larverne i at forsvinde. Hvis det er nødvendigt at flytte fiskelarver, må de ikke udsættes for luft, og net bør ikke bruges til at fjerne larver fra beholdere. Tidspunktet for en sådan overførsel varierer med arten og bør dokumenteres i rapporten. En overførsel er dog ikke altid nødvendig.

Vand

14. Som testvand kan anvendes vand af enhver beskaffenhed, hvori den art, der anvendes i testen, udviser passende langtidsoverlevelse og vækst (se tillæg 4). Vandets kvalitet skal være ensartet i hele testperioden. For at sikre, at vand til fortynding ikke får urimelig indflydelse på testresultaterne (f.eks. ved at danne kompleks med testkemikaliet) eller ved at indvirke uheldigt på de præstationer, man forventer af fisk til yngel, bør man regelmæssigt udtage prøver til analyse. Målinger af tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), de vigtigste anioner og kationer (f.eks. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), ammoniak, samlet residual mængde chlorpesticider, samlet mængde organisk kulstof og opslæmmede faststoffer skal foretages, f.eks. hver sjette måned, såfremt man ved, at fortyndingsvandet har en relativt konstant kvalitet. Såfremt man ved, at vandet har variabel kvalitet, skal målingerne foretages oftere; hyppigheden afhænger af, hvor variabel kvaliteten er. I tillæg 4 er anført nogle kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand.

Testopløsninger

15. Til gennemstrømningstestene bruges et system, som kontinuerligt afmåler og fortynder en stamopløsning med testkemikaliet (f.eks. peristaltpumper, proportional diluter, saturator system) for at yde en række forskellige koncentrationer til testkamrene. Stamopløsningernes og fortyndingsvandets strømningshastigheder skal i løbet af testen kontrolleres regelmæssigt og må ikke variere mere end 10 % gennem hele testforløbet. En flow-hastighed svarende til volumen af mindst fem testkamre pr. døgn er fundet passende (3). Hvis belastningsgraden i punkt 19 overholdes, er en lavere flow-hastighed svarende til volumen af f.eks. 2-3 testkamre imidlertid mulig for at forhindre hurtig fjernelse af foder.
16. Testopløsninger med den valgte koncentration fremstilles ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsningen bør fortrinsvis fremstilles ved mekanisk opblanding eller omrystning af testkemikaliet i fortyndingsvandet (f.eks. ved omrøring og/eller ultralydbehandling). Saturation columns (solubility columns) eller passiv dosering (6) kan anvendes til fremstilling af en passende koncentreret stamopløsning. Det frarådes at bruge et opløsningsmiddel som bærestof. Hvis det er nødvendigt med et opløsningsmiddel, bør der imidlertid anvendes en parallel opløsningsmiddelkontrol med samme opløsningsmiddelkoncentration som kemikaliebehandlingerne, dvs. at opløsningsmiddelniveauerne fortrinsvis skal være de samme i alle koncentrationer og i opløsningsmiddelkontrollen. I visse fortyndersystemer kan det være teknisk vanskeligt; her bør opløsningsmiddelkoncentrationen i opløsningsmiddelkontrollen være den samme som for den højeste opløsningsmiddelkoncentration i behandlingsgruppen. Nærmere oplysninger om stoffer, der er vanskelige at teste, findes i OECD Guidance Document No. 23 on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (2). Hvis der bruges opløsningsmiddel, afgøres valget af opløsningsmiddel af stoffets kemiske egenskaber. OECD's vejledning nr. 23 anbefaler en maksimal koncentration på 100 µl/l. For at forhindre, at opløsningsmidlet potentielt får indflydelse på de målte endepunkter (7), anbefales det at holde opløsningsmiddelkoncentrationen så lav som muligt.
17. I den semistatistiske test kan man følge to forskellige procedurer ved udskiftning af testopløsningen. Enten fremstilles nye testopløsninger i rene beholdere, og overlevende æg og larver flyttes forsigtigt til de nye beholdere, eller også bibeholdes testorganismene i testbeholderne, mens en andel (mindst to tredjedele) af testopløsningen/kontrolvolumenet udskiftes.

FREM GANGSMÅDE

Eksponeringsbetingelser*Varighed*

18. Testen bør påbegyndes så hurtigt som muligt efter befrugtningen, og det foretrækkes, at æggene nedsænkes i testopløsningerne, inden blastocysten begynder at dele sig eller så hurtigt som muligt efter denne fase. Testens varighed afhænger af den anvendte art. Nogle anbefalede tider ses i tillæg 2.

Belastning

19. Antallet af befrugtede æg ved testens begyndelse skal kunne opfylde de statistiske krav. Æggene bør fordeles tilfældigt mellem de forskellige behandlinger, og der bør anvendes mindst 80 æg, ligeligt fordelt, til mindst fire replikate testkamre pr. koncentration. Belastningsgraden (biomasse pr. volumen af testopløsningen) bør være så lav, at den opløste iltkoncentration på mindst 60 % af luftmætningsværdien kan vedligeholdes uden beluftning i ægge- og larvefasen. Til gennemstrømningstest anbefales en belastningsgrad på ikke over 0,5 g/l pr. døgn og ikke over 5 g/l (våd vægt) opløsning på noget tidspunkt (3).

Lys og temperatur

20. Lysperioderne og vandtemperaturen skal passe til den art, der bruges i forsøget (se tillæg 2).

Fodring

21. Foder og fodring er af afgørende betydning, og det er vigtigt, at fiskene fodres med det rette foder til den enkelte livsfase fra et passende tidspunkt og på et niveau, der er tilstrækkeligt til at sikre normal vækst. Fodringen skal være nogenlunde ens på tværs af replikater, medmindre den justeres for at tage hensyn til dødelighed. Overskydende foder og ekskrementer bør fjernes i nødvendigt omfang for at undgå ophobning af affald. Detaljerede fodersystemer er anført i tillæg 3, men efterhånden som der høstes erfaring, forbedres foder- og fodringssystemerne løbende for at øge overlevelsen og optimere væksten. Levende foder beriger miljøet og bør derfor anvendes i stedet for eller som supplement til tør- eller frostfoder, når det er hensigtsmæssigt i forhold til arten og livsfasen.

Testkoncentrationer

22. Normalt kræves fem koncentrationer af testkemikallet, med mindst fire replikater pr. koncentration, med en konstant afstandsfaktor, som ikke overstiger 3,2. Hvis der foreligger oplysninger om den akutte test, fortrinsvis med samme art og/eller en forprøve, bør der tages højde herfor (1), når man vælger området for testkoncentrationerne. Alle informationskilder bør dog tages i betragtning, når man vælger området for testkoncentrationerne, herunder kilder som analogislutning og testdata om akut toksicitet for fiskeembryoner. En grænsetest, eller en udvidet grænsetest, med færre end fem koncentrationer i den endelige test kan accepteres, hvis der kun skal fastlægges empiriske NOEC-værdier. Begrundelse skal anføres, hvis der anvendes færre end fem koncentrationer. Det er ikke nødvendigt at teste koncentrationer højere end svarende til 96 timer LC₅₀ eller 10 mg/l, afhængigt af hvilken af disse der er lavest.

Kontroller

23. En fortyndingsvandkontrol og, om nødvendigt, en opløsningsmiddelkontrol, som indeholder opløsningsmidlet som bærestof, bør foretages ud over koncentrationsserien med testkemikallet (se punkt 16).

Hyppighed af analyser og målinger

24. Inden eksponeringsperioden påbegyndes, kontrolleres det, at kemikaliets tilførselssystemet til alle replikater fungerer korrekt (f.eks. ved måling af testkoncentrationer). De nødvendige analysemetoder bør være fastlagt, herunder en passende bestemmelsesgrænse (LOQ) og tilstrækkeligt kendskab til stoffets stabilitet i testsystemet. Under testen bestemmes koncentrationerne af testkemikaliets med regelmæssige mellemrum for at bestemme eksponeringen. Der skal foretages mindst fem bestemmelser. I gennemstrømningssystemer bør der foretages analytiske målinger af testkemikaliets i en replikat pr. koncentration mindst en gang om ugen, idet der systematisk skiftes mellem replikaterne. Yderligere analytiske bestemmelser vil ofte forbedre kvaliteten af testresultaterne. Det kan være nødvendigt at filtrere prøverne for at fjerne eventuelle partikler (f.eks. med et filter med en porestørrelse på 0,45 µm) eller centrifugere dem for at sikre, at bestemmelserne foretages på kemikaliets i ægte opløsning. For at reducere adsorptionen af testkemikaliets bør filtrene være mættet før brug. Når de målte koncentrationer ikke ligger inden for 80-120 % af den nominelle koncentration, bør effektkoncentrationerne bestemmes og udtrykkes i forhold til den aritmetiske gennemsnitskoncentration for gennemstrømningstest (oplysninger om beregning af det aritmetiske gennemsnit findes i tillæg 6 til forsøgsmetode C.20 (8)) og udtrykkes i forhold til det geometriske gennemsnit af de målte koncentrationer ved semistatistiske test (se kapitel 5 i OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (2)).
25. Under forsøget bør opløst ilt, pH og temperatur måles i alle testbeholdere, mindst en gang om ugen, og saltholdigheden og hårdheden om fornødent ved forsøgets start og slutning. Temperaturen skal fortrinsvis overvåges kontinuerligt i mindst en testbeholder.

Observationer

26. **Embryonets udviklingstrin:** Det embryonale stadie bør fastslås så sikkert som muligt ved testens begyndelse, hvor embryonet udsættes for testkemikaliets. Dette kan gøres ved undersøgelse af en repræsentativ samling æg, som på passende vis præpareres og renses.
27. **Udklækning og overlevelse:** Observationer om udklækning og overlevelse foretages mindst en gang om dagen og noteres. Hvis der observeres svamp på æg på et tidligt trin i embryonets udvikling (f.eks. på forsøgets dag et eller to), bør de pågældende æg tælles og fjernes. Døde embryoner, larver og fiskeyngel bør fjernes med det samme, eftersom de kan henfalde hurtigt og ødelægges af de andre fisk. Meget stor omhu skal udvises, når døde individer fjernes, så nærtliggende æg eller larver ikke fysisk beskadiges. Tegn på død varierer afhængigt af art og udviklingsstadium. For eksempel:
- for befrugtede æg: særligt i de tidlige stadier et tydeligt tab af gennemsigtighed og ændring i farve forårsaget af koagulation og/eller bundfældelse af proteiner, hvilket medfører en hvid uklarhed
 - for embryoner, larver og fiskeyngel: manglende bevægelighed og/eller manglende respirationsbevægelser og/eller manglende hjerteslag og/eller manglende respons på mekaniske stimuli.
28. **Abnormt udseende:** Antallet af larver eller fiskeyngel, der udviser abnorm kropsform, skal noteres med passende mellemrum afhængigt af testens varighed og den beskrevne abnormitet. Det skal bemærkes, at abnorme larver og fiskeyngel optræder almindeligt og kan opgøres til adskillige procent i kontrollerne hos visse arter. Når misdannelser og dertil knyttet abnorm adfærd betragtes som så alvorlige, at organismen lider betragteligt herunder, og har nået et niveau, hvor den ikke vil vende tilbage til en normal tilstand, kan organismen fjernes fra forsøget. Sådanne dyr skal aflives og indgår i dødeligheden i forbindelse med den efterfølgende dataanalyse. Normal embryonal udvikling er dokumenteret for de fleste fiskearter, der anbefales i denne forsøgsmetode (9) (10) (11) (12).
29. **Abnorm opførsel:** Abnorm opførsel, f.eks. hyperventilation, ukoordineret svømning, atypisk ubevægelighed og atypisk adfærd ved fodring, skal noteres med passende intervaller afhængigt af testens varighed (f.eks. en gang om dagen for arter, der lever i varmt vand). Disse virkninger kan, når de opdages, selv om de er vanskelige at kvantificere, hjælpe med til at tolke mortalitetsdata.

30. **Vægt:** Ved forsøgets afslutning skal samtlige overlevende fisk som minimum vejes for replikater (registrering af antal dyr i replikatet og gennemsnitsvægten pr. dyr): Vådvægt (duppet tør) er at foretrække, men oplysninger om tørvægt kan også registreres (13).
31. **Længde:** Ved forsøgets afslutning måles individernes længde. Totallængden foretrækkes, men hvis der forekommer finneråd (svamp) ved halefinnen eller erosion af finner, kan standardlængden anvendes. Samme metode bør anvendes til alle fisk i en given test. Den individuelle længde kan måles ved enten f.eks. skydelærer, digitalt kamera eller kalibreret okularmikrometer. Typiske minimumslængder er defineret i tillæg 2.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

32. Det anbefales, at testdesignet og valget af statistisk test muliggør tilstrækkelig power (mindst 80 %) til at opdage ændringer af biologisk betydning i endepunkter, hvor der skal registreres en NOEC-værdi. Rapporteringen af relevante effektkoncentrationer og parametre kan afhænge af de lovgivningsmæssige rammer. Hvis der skal registreres en EC_x -værdi, bør testdesignet og valget af regressionsmodel gøre det muligt at beregne EC_x således at i) det registrerede 95 %-konfidensinterval for EC_x ikke omfatter nul og ikke er for bredt, ii) 95 %-konfidensintervallet for det forventede gennemsnit ved EC_x ikke omfatter kontrolgennemsnittet, og iii) der ikke er tale om betydelig manglende overensstemmelse mellem regressionsmodellen og dataene. Begge metoder kræver identifikation af den procentvise ændring for hvert af de endepunkter, som det er vigtigt at undersøge eller beregne. Testdesignet skal tilpasses til dette formål. Når ovennævnte betingelser for fastsættelsen af EC_x ikke er opfyldt, bør NOEC-metoden anvendes. Det er ikke sandsynligt, at den samme procentvise ændring gælder for alle endepunkter, og det er heller ikke sandsynligt, at der kan designes et forsøg, som opfylder disse kriterier for alle endepunkter, og man bør derfor i forbindelse med testdesignet fokusere på de endepunkter, der er vigtige for de respektive forsøg. Statistiske flowdiagrammer og retningslinjer for de enkelte metoder findes i tillæg 5 og 6 som hjælp til databehandlingen og valget af den mest egnede statistiske test eller model. Andre statistiske metoder kan anvendes, forudsat at de er videnskabeligt begrundede.
33. Det er, for at beregne variationen inden for hvert sæt af replikater, nødvendigt at bruge variansanalyse eller kontingenstabeller, og der bør anvendes passende statistiske metoder på grundlag af denne analyse. For at foretage en multisammenligning mellem resultaterne fra de enkelte koncentrationer og kontrollerne anbefales step-down Jonckheere-Terpstra-testen eller Williams' test til kontinuerlige responser og step-down Cochran-Armitage-testen til enten/eller-responser, der stemmer overens med et monotont koncentration/respons-forhold uden tegn på ekstra-binomial varians (14). Hvis der er tegn på ekstra-binomial varians, anbefales Rao-Scotts modificerede version af Cochran-Armitage-testen (15) (16) eller Williams' eller Dunnetts test (efter en arcsin-kvadratrodstransformation) eller Jonckheere-Terpstra-testen anvendt på replikatandele. Hvis dataene ikke stemmer overens med et monotont koncentration/respons-forhold, kan Dunnetts eller Dunns test eller Mann-Whitney-testen være nyttig til kontinuerlige responser og Fishers eksakte test til enten/eller-responser (14) (17) (18). I forbindelse med anvendelsen af enhver statistisk metode eller model bør det sikres, at metodens eller modellens betingelser er opfyldt (f.eks. at variabiliteten mellem kamrene er beregnet, og at der tages højde herfor i forsøgsdesignet og i den anvendte test eller model). Dataene skal evalueres med hensyn til normalitet, og tillæg 5 indeholder oplysninger om, hvad der skal ske med residualerne fra en variansanalyse. Tillæg 6 indeholder supplerende betragtninger om regressionsmodellen. Det bør overvejes at anvende transformationer for at opfylde betingelserne for en statistisk test. Der skal dog udvises forsigtighed med at anvende transformationer med henblik på fitning af en regressionsmodel, eftersom en ændring på 25 % i den utransformerede respons ikke svarer til en ændring på 25 % i en transformeret respons. I alle analyser er testkammeret, ikke de enkelte fisk, analyseenheden og forsøgsenheden, hvilket bør komme til udtryk i både hypotesetesten og regressionsanalysen (3) (14) (19) (20).

Testrapport

34. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

Stof med kun en bestanddel

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

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

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

Testart:

- videnskabeligt navn, stamme, kilde og metode til indsamling af befrugtede æg og behandlingen af dem.

Testbetingelser:

- den anvendte forsøgsmetode (f.eks. semistatisk eller gennemstrømning, belastning)
- lysperiode(r)
- testdesign (fx antal testkamre og replikater, antal æg pr. replikat, testkammerets materiale og størrelse (højde, bredde, volumen), vandvolumen pr. testkammer)
- fremstillingsmetode til stamopløsning og hyppighed af udskiftning (hvis der er anvendt opløsningsmiddel, bør dets koncentration anføres)
- metode til dosering af testkemikaliets (f.eks. pumper, fortyndingssystemer)
- metodens genfindingsgrad og de nominelle testkoncentrationer, de målte værdiers gennemsnit og standardafvigelse i testbeholderne, metoden, hvorved de er opnået, samt dokumentation for, at målingerne refererer til testkemikaliets faktiske koncentration i opløsning
- karakteristisk af fortyndningsvandet: pH, hårdhedsgrad, temperatur, koncentration af opløst ilt, niveau for residual-chlor (hvis målt), total organisk kulstof (hvis målt), opslæmmede substanser (hvis målt), saltindhold i testmediet (hvis målt) og enhver anden ting, som er målt
- vandkvalitet i testbeholderne, pH, hårdhedsgrad, temperatur og koncentration af opløst ilt
- detaljerede oplysninger om fodring (f.eks. fodertype(r), -kilde, -mængde og fodringshyppighed).

Resultaterne anført individuelt (eller pr. replikat) og som gennemsnit og variationskoefficient, hvis det er relevant, for følgende endepunkter:

- bevis på, at testdyrene gennemsnitligt har overlevet i kontrollerne svarende til den accepterede standard (tillæg 2)
- data vedrørende mortalitet på hvert stadie (embryon, larve og fiskeyngel) og kumulativ mortalitet
- antal dage til klækningen, det daglige antal larver, der klækkes, og sluttidspunkt for klækning
- antal sunde fisk ved afslutning af testen
- data vedrørende længde (angiv enten standardlængde eller totallængde) og vægt af overlevende dyr
- morfologiske abnormiteter beskrives, hvis de forekommer, og antal angives
- adfærdspåvirkninger beskrives, hvis de forekommer, og antal angives

- statistisk analysemetode (regressionsanalyse eller variansanalyse) og behandling af data (anvendt statistisk test eller model)
- koncentration uden observeret effekt ved hver måling (NOEC)
- laveste koncentration med observeret effekt (ved $p = 0,05$) ved hver måling (LOEC)
- EC_x for hver måling, hvis det er relevant, og konfidensintervaller (f.eks. 90 % eller 95 %) og en graf med den fittede model, der blev brugt til beregningen, koncentrationsresponskurvens hældning, regressionsmodellens formel, de estimerede modelparametre og deres standardafvigelse.

Enhver afvigelse fra forsøgsmetoden.

Diskussion af resultaterne, herunder den eventuelle betydning af fravigelser fra denne forsøgsmetode for resultaterne.

Tabel 1

Fiskearter, som er anbefalet til test

FERSKVAND	BRAKVAND og SALTVAND
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Regnbueørred	<i>Cyprinodon variegatus</i> Fårehovedelritse
<i>Pimephales promelas</i> Tykhovedet elritse	<i>Menidia</i> sp. Stribefisk
<i>Danio rerio</i> Zebrafisk	
<i>Oryzias latipes</i> Japansk risfisk	

LITTERATUR

- 1) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.171, OECD, Paris.
- 2) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23, OECD Paris.
- 3) ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241-88. 26 pp.
- 4) Brauhn, J.L. and R.A. Schoettger (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.
- 5) Brungs, W. A. og B. R. Jones (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- 6) Adolfsson-Erici, *et al.* (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.
- 7) Hutchinson, T.H. *et al.* (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69-92.
- 8) Kapitel C.20 i dette bilag, *Daphnia magna* formeringstest.

- 9) Hansen, D.J. and P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (*Cyprindon variegatus*) for life-cycle toxicity tests, In *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation* (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink), ASTM STP 634.
 - 10) Kimmel, H. B. *et al.* (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203:253–310.
 - 11) Gonzalez-Doncel, M. *et al.* (2005), A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthyidae) *Journal of Applied Ichthyology*, 20:1–14.
 - 12) Devlin, E.W. *et al.* (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, *Pimephales promelas* Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C.
 - 13) Oris, J.T., S.C. Belanger, and A.J. Bailer, (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, *Environmental Toxicology and Chemistry* 31; 2, 370 — 376.
 - 14) OECD (2006). *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.
 - 15) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics* 48, 577-585.
 - 16) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, *Statistics in Medicine* 18, 1373-1385.
 - 17) Dunnett C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of American Statistical Association*, 50, 1096-1121.
 - 18) Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.
 - 19) Rand, G.M. and S.R. Petrocelli (1985), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publication Corporation, New York.
 - 20) McClave, J.T., J.H. Sullivan and J.G. Pearson (1980). *Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data*, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.
-

Tillæg 1

DEFINITIONER

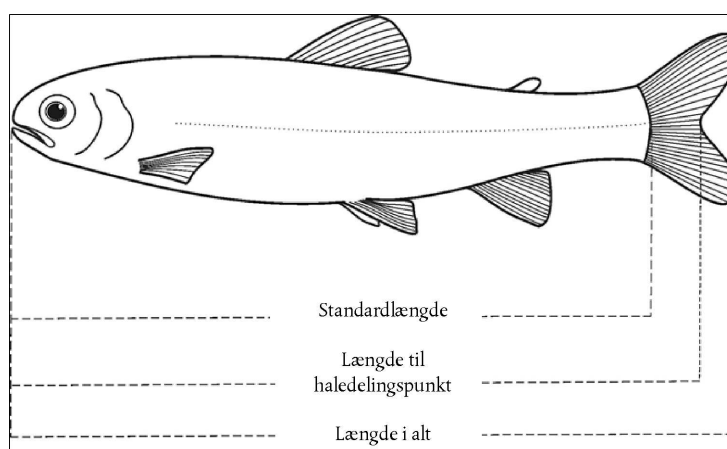
Længde til haledelingspunkt (FL): angiver længden fra snudespids til enden af halefinsens midterste finnestråle og bruges ved fisk, hvor det er svært at afgøre, hvor rygsøjlen ender (www.fishbase.org)

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

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

Figur 1

Beskrivelse af de forskellige anvendte længder



Kemikalie: et stof eller en blanding

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

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

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

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

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

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Den Internationale Union for Ren og Anvendt Kemi).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification

TESTBETINGELSER, VARIGHED OG OVERLEVELSESKRITERIER FOR DE ANBEFALEDE ARTER

ARTER	TESTBETINGELSER			ANBEFALET TESTVARIGHED	Typisk gennemsnitlig minimumstotal længde for kontrolfisk ved forsøgets slutning (mm) ⁽¹⁾	OVERLEVELSE KONTROLLER (minimum)	
	Temperatur (°C)	Saltindhold (‰ ₀₀)	Lysperiode (timer)			Klækningssucces	Succes efter klækning

Ferskvand:

<i>Oncorhynchus mykiss</i> Regnbueørred	10 ± 1,5 ⁽²⁾		12-16 ⁽³⁾	To uger, efter at kontrollerne selv indtager foder (eller 60 dage efter klækning)	40	75 %	75 %
<i>Pimephales promelas</i> Tykhovedet elritse	25 ± 1,5		16	32 dage fra forsøgets begyndelse (eller 28 dage efter klækning)	18	70 %	75 %
<i>Danio rerio</i> Zebrafisk	26 ± 1,5		12-16 ⁽³⁾	30 dage efter klækning	11	70 %	75 %
<i>Oryzias latipes</i> Japansk risfisk	25 ± 2		12-16 ⁽³⁾	30 dage efter klækning	17	80 %	80 %

Brakvand og saltvand:

<i>Cyprinodon variegatus</i> Fårehovedelritse	25 ± 1,5	15-35 ⁽⁵⁾	12-16 ⁽⁴⁾	32 dage fra forsøgets begyndelse (eller 28 dage efter klækning)	17	75 %	80 %
<i>Menidia sp.</i> Stribefisk	22-25	15-35 ⁽⁵⁾	13	28 dage	20	80 %	60 %

Signaturforklaring:

- ⁽¹⁾ Den typiske gennemsnitlige minimumstotal længde er ikke et validitetskriterium, men afvigelser, der ligger under det angivne tal, bør undersøges nøje i forhold til testens følsomhed. Den gennemsnitlige minimumstotal længde beregnes ud fra en række data, der er tilgængelige på det pågældende tidspunkt.
- ⁽²⁾ Afhængigt af hvilken stamme af regnbueørred der testes, kan det være nødvendigt at bruge andre temperaturer. Fisk til yngel skal holdes ved samme temperatur som æggene. Efter modtagelse af æg fra en kommerciel opdrætter er det nødvendigt med en kort tilpasning (f.eks. 1-2 timer) til testtemperaturen efter ankomsten.
- ⁽³⁾ Mørke for larver op til en uge efter klækning, undtagen ved inspektion, siden svagt lys i resten af forsøget (12-16 timers lysperiode) ⁽⁴⁾.
- ⁽⁴⁾ Lysforholdene bør være konstante under alle testbetingelser.
- ⁽⁵⁾ For hver test foretages dette til ± 2‰₀₀.

VEJLEDNING I FODRING OG HÅNDTERING AF DYR TIL YNGEL OG TESTDYR AF ANBEFALEDE ARTER

ARTER	FODER (*)				OVERFØRSELSTID EFTER KLÆKNING	TID TIL FØRSTE FODRING
	Fisk til yngel	Nyudklækkede larver	Ungfisk			
			Art	Hyppighed		

Ferskvand:

<i>Oncorhynchus mykiss</i> Regnbueørred	ørredfoder	ingen ^(a)	ørredstartfoder BSN	2-4 fodringer om dagen	14-16 dage efter klækning eller ved swim-up (ikke afgørende)	19 dage efter klækning eller ved swim-up
<i>Pimephales promelas</i> Tykhovedet elritse	BSN, foder i flager og FBS	BSN	BSN48, foder i flager	2-3 gange om dagen	ved klækning på 90 %	2 dage efter klækning
<i>Danio rerio</i> Zebrafisk	BSN, foder i flager	kommercielt larvefoder, protozoer ^(b) , protein ^(c)	BSN48, foder i flager,	BSN en gang om dagen foder i flager to gange om dagen	ved klækning på 90 %	2 dage efter klækning
<i>Oryzias latipes</i> Japansk risfisk	foder i flager	BSN, foder i flager (eller protozoer eller rotifera)	BSN48, foder i flager (eller rotifera)	BSN en gang om dagen; foder i flager to gange om dagen <u>eller</u> foder i flager og rotifera en gang om dagen	ikke relevant	6-7 dage efter gydning

Brakvand og saltvand:

<i>Cyprinodon variegatus</i> Fårehovedelritse	BSN, foder i flager og FBS	BSN	BSN48	2-3 fodringer om dagen	ikke relevant	1 dag efter klækning/swim-up
<i>Menidia sp.</i> Stribefisk	BSN48, foder i flager	BSN	BSN48	2-3 fodringer om dagen	ikke relevant	1 dag efter klækning/swim-up

Signaturforklaring:

(*) Foder gives til mætning. Overskydende foder og ekskrementer bør fjernes i nødvendigt omfang for at undgå ophobning af affald

FBS frosne saltsøkrebs; voksne *Artemia* sp

BSN saltsøkrebs, nauplii; nyudklækkede

BSN48 saltsøkrebs, nauplii; 48 timer gamle

^(a) larver med blommesæk skal ikke fodres^(b) filtreret fra blandingskultur^(c) granulat fra fermentering

Tillæg 4

KEMISKE EGENSKABER AF ACCEPTABELT VAND TIL FORTYNDING

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

Tillæg 5

STATISTISK VEJLEDNING I BESTEMMELSE AF NOEC

Generelt

Replikatbeholderen er analyseenheden. Med henblik på kontinuerlige målinger, såsom størrelse, beregnes replikat-gennemsnittet eller medianen, og disse replikatværdier er de data, der skal analyseres. De anvendte tests power bør påvises, fortrinsvis baseret på en relevant historisk database for hvert laboratorium. Den størrelsesvirkning, der kan påvises med 75-80 % power, bør angives for hvert endepunkt med den statistiske test, der skal bruges.

De databaser, der er tilgængelige på tidspunktet for udviklingen af denne forsøgsmetode, er afgørende for den power, der kan opnås med de anbefalede statistiske metoder. De enkelte laboratorier bør dokumentere deres evne til at opfylde dette krav til power, enten ved at gennemføre deres egne styrkeanalyser eller ved at påvise, at variationskoefficienten (CV, Coefficient of Variation) for hver respons ikke overstiger 90-percentilen for de variationskoefficienter, der blev brugt ved udviklingen af testvejledningen. Tabel 1 angiver disse CV'er. Står der alene gennemsnits- eller medianværdier for replikatet til rådighed, kan man se bort fra CV inden for replikatet.

Tabel 1

90-percentil-CV'er for udvalgte ferskvandsarter

Art	Respons	CV_mellem replikater	CV_inden for replikater
Regnbueørred	Længde	17,4	9,8
	Vægt	10,1	28
Tykhovedet elritse	Længde	16,9	13,5
	Vægt	11,7	38,7
Zebrafisk	Længde	43,7	11,7
	Vægt	11,9	32,8

I næsten alle de statistiske test, der bruges til at evaluere laboratoriers toksikologiske undersøgelser, er det sammenligninger mellem behandlingsgrupper og kontrollen, der er interessante. Det er derfor ikke hensigtsmæssigt at stille krav om en signifikant ANOVA-F-test inden brug af Dunnetts eller Williams' test eller en signifikant Kruskal-Wallis-test inden brug af Jonckheere-Terpstra-testen, Mann-Whitney-testen eller Dunns test (Hochberg and Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson *et al.* 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

Dunnetts test har indbygget multiplicitetsjustering, og den forekomst af falsk positive resultater og falsk negative resultater, der er forbundet hermed, påvirkes negativt ved brug af F-testen som gatekeeper. Tilsvarende er step-down Williams- og Jonckheere-Terpstra-test med et signifikansniveau på 0,05 på hvert trin forbundet med en generel forekomst af falsk positive resultater på 5 %, og denne forekomst og testen power påvirkes negativt ved brug af F- eller Kruskal-Wallis-testen som gatekeeper. Mann-Whitney-testen og Dunns test skal justeres, så der tages højde for multiplicitet. Det anbefales at bruge Bonferroni-Holm-justering.

En omfattende diskussion af de fleste anbefalinger vedrørende hypotesetest og verifikation af de antagelser, der ligger til grund for disse test, findes i OECD (2006), som også indeholder en omfattende bibliografi.

Behandling af kontroller, når der anvendes et opløsningsmiddel

Hvis der anvendes et opløsningsmiddel, bør der både anvendes en kontrol med fortyndingsvand og en opløsningsmiddelkontrol. De to kontroller bør sammenlignes for hver respons og kombineres med henblik på statistisk analyse, hvis der ikke konstateres signifikante forskelle mellem kontrollerne. Ellers anvendes opløsningsmiddelkontrollen til bestemmelse af NOEC eller beregning af EC_{50} og vandkontrollen bruges ikke. Se restriktion i validitetskriterierne (punkt 7).

For så vidt angår længde, vægt, andel klækkede æg eller dødelighed for larver eller abnorme larver og første eller sidste dag for klækning eller swim-up, bør T-testen eller Mann-Whitney-testen bruges til sammenligning af kontrollen med fortyndingsvand og opløsningsmiddelkontrollen ved et signifikansniveau på 0,05, idet der ses bort fra alle behandlingsgrupper. Resultaterne af disse test rapporteres.

Størrelsesmålinger (længde og vægt)

De enkelte fisks længde- og vægtværdier kan være normalfordelt eller log-normalfordelt. Under alle omstændigheder har replikatgennemsnitsværdierne tendens til at være normalt fordelt i kraft af den centrale grænseværdisætning og som bekræftet af data fra langt over 100 ELS-undersøgelser af tre ferskvandsarter. Hvis dataene eller historiske databaser tyder på en log-normal fordeling af de enkelte fisks størrelsesværdier, kan det logaritmiske replikatgennemsnit for de enkelte fisks værdier alternativt beregnes, og de data, der skal analyseres, kan i givet fald være anti-logaritmerne til disse gennemsnitslogaritmer for replikaterne.

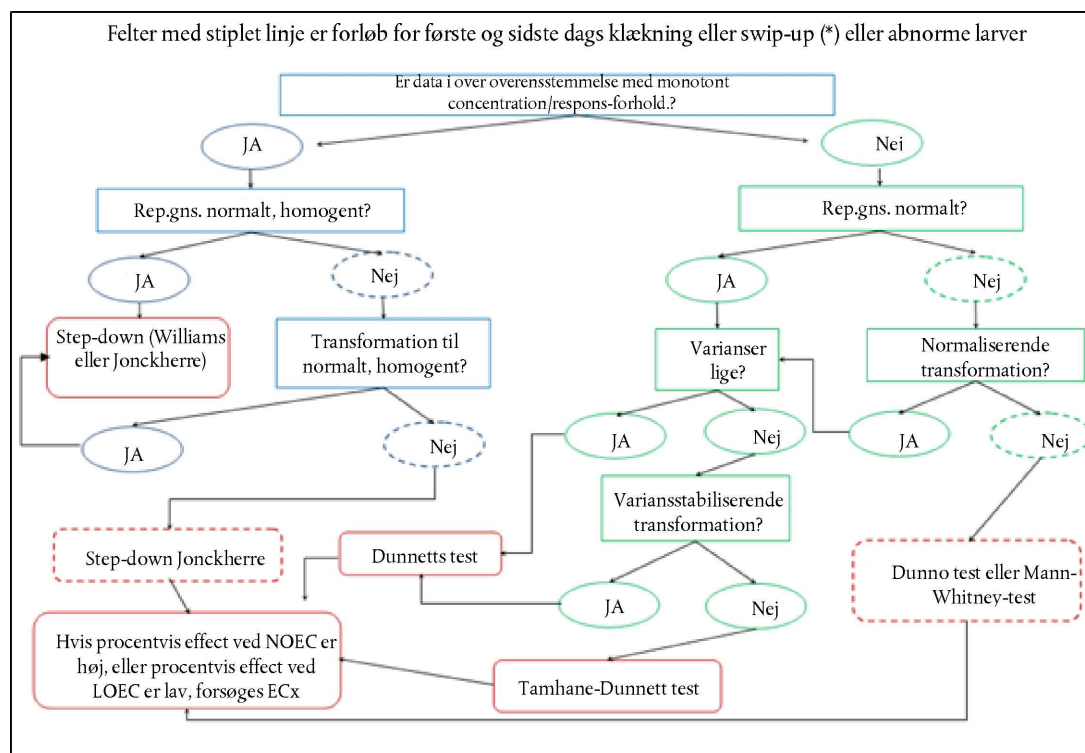
Dataene evalueres med hensyn til overensstemmelse med normal fordeling og varianshomogenitet. Med henblik herpå anvendes residualerne fra en variansanalyse med koncentration som den eneste forklarende klassevariabel. Visuel bestemmelse kan foretages ud fra spredningsplot og histogrammer eller stamme-og-blad-plot. Alternativt kan en formel test, f.eks. Shapiro-Wilk eller Anderson-Darling, anvendes. Overensstemmelse med varianshomogenitet kan vurderes ud fra en visuel undersøgelse af samme spredningsplot eller formelt på grundlag af Levenes test. Parametriske test (f.eks. Williams' eller Dunnetts test) skal som de eneste vurderes med hensyn til normalitet eller varianshomogenitet.

Man bør være opmærksom på mulige afvigende værdier og deres indvirkning på analysen. Tukeys test for afvigende værdier og visuel kontrol af samme diagrammer over residualer som beskrevet ovenfor kan anvendes. Det skal bemærkes, at observationerne er hele replikater, hvilket betyder, at udeladelse af en afvigende værdi fra analysen kun må ske efter omhyggelig afvejning.

De statistiske test, der bruger de særlige kendetegn ved forsøgsdesignet og biologisk forventning, er step-down trend test som f.eks. Williams' test og Jonckheere-Terpstra-testen. Disse test forudsætter et monotont koncentration/respons-forhold, og data bør vurderes med hensyn til overensstemmelse med denne antagelse. Det kan ske visuelt ud fra et spredningsplot af replikatgennemsnittene i forhold til testkoncentrationen. Spredningsplottet kan med fordel suppleres med et stykvist lineært plot, der forbinder koncentrationsgennemsnittene vægtet i forhold til replikatprøvestørrelsen. Stor afvigelse fra monotoni i dette stykvise lineære plot tyder på, at det er nødvendigt at bruge andre test end trend test. Alternativt kan der anvendes formelle test. En enkel formel test er beregning af lineære og kvadratiske kontraster af koncentrationsgennemsnittene. Hvis den kvadratiske kontrast er signifikant, og den lineære kontrast ikke er signifikant, er det et tegn på, at der kan være et problem med monotoni, som bør evalueres yderligere ud fra diagrammer. Hvis normalitet eller varianshomogenitet kan være et problem, kan disse kontraster udledes af rangordentransformerede data. Alternative procedurer, såsom Bartholomews test for monotoni, kan anvendes, men tilfører kompleksitet.

Figur 2

NOEC-flowdiagram — størrelsesmålinger (længde og vægt)



(*) Disse responser opfylder aldrig forudsætningerne for parametriske analyser eller modeller

Medmindre dataene ikke opfylder betingelserne for disse test, bestemmes NOEC ved hjælp af step-down-anvendelse af Williams' test eller Jonckheere-Terpstra-testen. OECD (2006) indeholder nærmere oplysninger om disse metoder. For så vidt angår data, der ikke opfylder betingelserne for en step-down trend test, kan Dunnetts test eller Tamhane-Dunnett-testen (T3) anvendes. Begge har indbyggede justeringer for multiplicitet. Disse test forudsætter normalitet og, i forbindelse med Dunnetts test, varianshomogenitet. Hvis disse betingelser ikke er opfyldt, kan Dunns ikke-parametriske test anvendes. OECD (2006) indeholder nærmere oplysninger om alle disse test. Figur 2 giver et overblik over, hvordan man finder den foretrukne test.

Klækkede æg og larveoverlevelse

Dataene er andele af æg, der klækkes, eller larver, der overlever, i de enkelte replikater. Disse andele bør vurderes med hensyn til ekstra-binomial varians, som er almindelig, men ikke universel for sådanne målinger. Flowdiagrammet i figur 3 kan bruges til at vælge test; detaljerede beskrivelser findes i teksten.

To test er almindeligt brugt. Der er tale om Tarones C(α)-test (Tarone, 1979) og »chi-i anden-testen«, som anvendes særskilt på hver testkoncentration. Hvis der konstateres ekstra-binomial varians i blot en testkoncentration, bør der anvendes metoder, som tilgodeser dette.

Formel 1

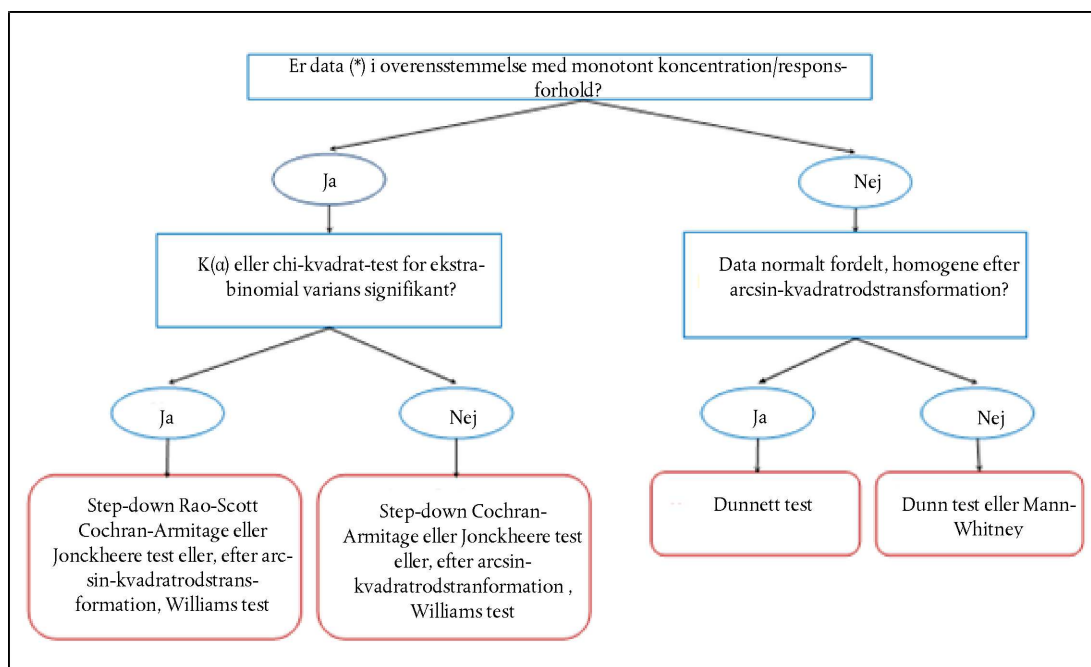
Tarones C(α)-test (Tarone 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^m \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1 - \hat{p})} - \sum_{j=1}^m n_j}{\left\{ 2 \sum_{j=1}^m n_j (n_j - 1) \right\}^{1/2}}$$

hvor $\hat{p}$ er den gennemsnitlige andel for en given koncentration, m er antallet af replikatbeholdere, n_j er antallet af emner i replikat j , og x_j er antallet af emner i den pågældende replikat med respons, f.eks. ikke udklækkede eller døde. Denne test anvendes særskilt på hver enkelt koncentration. Denne test kan betragtes som en »tilpasset chi-i-anden-test«, men begrænsede power-simuleringer med Tarones test har vist, at den er mere velegnet end en »chi-i-anden-test«.

Figur 3

NOEC-flowdiagram for klækkede æg og larvedødelighed



(*) Data er replikatandel.

Hvis der ikke er nogen signifikant dokumentation for ekstra-binomial varians, kan step-down Cochran-Armitage-testen anvendes. Denne test tager ikke højde for replikater, så hvis der er dokumentation herfor, tager Rao-Scotts justering af Cochran-Armitage-testen (RSCA) højde for replikater, replikatstørrelser og ekstra-binomial varians og anbefales. Alternative test omfatter step-down Williams- og Jonckheere-Terpstra-test og Dunnetts test som beskrevet for størrelsesmålinger. Disse test finder anvendelse, uanset om der er ekstra-binomial varians, men har en noget lavere power (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao and Scott 1992, 1999, fung *et al.* 1994, 1996).

Første eller sidste dags klækning eller swim-up

Responserne er et heltal, der angiver, hvilken dag i testen den angivne observation er foretaget for en given replikatbeholder. Værdiintervallet er generelt meget begrænset, og der er ofte høje andele af bundne værdier, f.eks. observeres samme første klækningsdag i alle kontrolreplikater og eventuelt i en eller to lave testkoncentrationer. Parametriske test, som Williams' og Dunnetts test, er ikke egnede til sådanne data. Medmindre der er dokumentation for betydelig manglende monoton, er step-down Jonckheere-Terpstra-testen meget velegnet til at spore testkemikaliets virkninger. I modsat fald kan Dunns test anvendes.

Abnormiteter hos larver

Responsen er antallet af larver med en form for abnormitet. Responsen forekommer ofte sjældent og har visse af de samme problemer som første klækningsdag og udviser undertiden uregelmæssigheder i koncentrationsrespons. Hvis dataene i det mindste nogenlunde følger en monoton koncentrationsform, er step-down Jonckheere-Terpstra-testen velegnet til at påvise virkninger. I modsat fald kan Dunns test anvendes.

Henvisninger

Agresti, A. (2002); *Categorical Data Analysis*, second edition, Wiley, Hoboken.

Dunnett C. W. (1955); A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, *J. American Statistical Association* 50, 1096-1121.

Dunn O. J. (1964); Multiple Comparisons Using Rank Sums, *Technometrics* 6, 241-252.

Dunnett C. W. (1964); New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics* 20, 482-491.

Fung, K.Y., D. Krewski, J.N.K. Rao, A.J. Scott (1994); Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, *Risk Analysis* 14, 639-648.

Fung, K.Y., D. Krewski, R.T. Smythe (1996); A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, *Canadian Journal of Statistics* 24, 431-454.

Hochberg, Y. and A. C. Tamhane (1987); *Multiple Comparison Procedures*, Wiley, New York.

Hsu, J.C. (1996); *Multiple Comparisons: Theory and Methods*; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere A. R. (1954); A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, *Biometrika* 41, 133.

Morgan, B.J.T. (1992); *Analysis of Quantal Response Data*, Chapman and Hall, London.

OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment, No. 54. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992) — A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics* 48, 577-585.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1999) — A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, *Statistics in Medicine* 18, 1373-1385.

Robertson, T., Wright F.T. and Dykstra R.L. (1988); *Order restricted statistical inference*, Wiley.

Tarone, R.E. (1979); Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, *Biometrika* 66, 585-590.

Williams D.A. (1971); A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics* 27, 103-117.

Williams D.A. (1972); The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics* 28, 519-531.

Williams D. A. (1975); The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratology, *Biometrics* 31, 949-952.

Williams D.A. (1977); Some inference procedures for monotonically ordered normal means, *Biometrika* 64, 9-14.

Tillæg 6

STATISTISK VEJLEDNING I REGRESSIONSBEREGNING

Generelt

De observationer, der bruges til fitning af en model, er replikatgennemsnit (længde og vægt) eller replikatandele (klækkede æg og larvedødelighed) (OECD 2006).

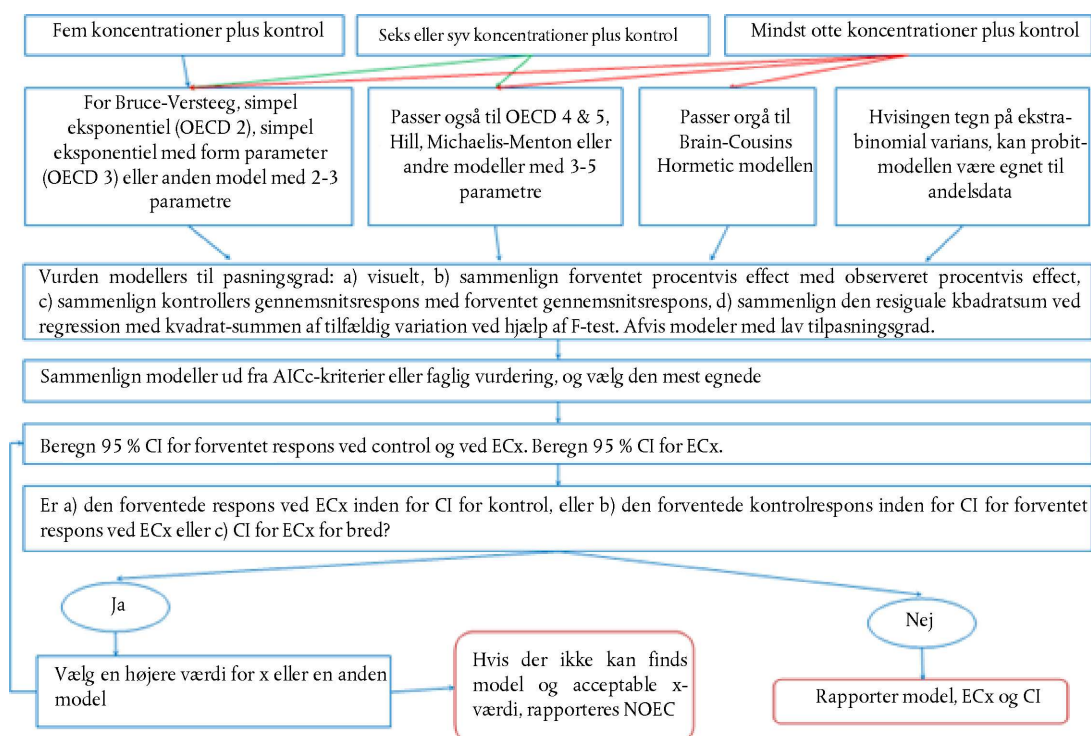
Det anbefales generelt at anvende vægtet regressionsanalyse med replikatprøvestørrelse som vægt. Der kan bruges andre vægtningsmetoder, f.eks. vægtning i forhold til forventet gennemsnitsrespons eller en kombination af denne og replikatprøvestørrelsen. Vægtning i forhold til den reciprokke værdi for variansen i koncentrationsprøven anbefales ikke (Bunke *et al.* 1999, Seber and Wild, 2003, Motulsky and Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

Enhver transformation af responser inden analysen bør sikre observationernes uafhængighed, og EC_x og denne værdis konfidensgrænser bør udtrykkes i de oprindelige måleenheder og ikke de transformerede enheder. En ændring på 20 % i logaritmen for længde svarer f.eks. ikke til en ændring på 20 % i længde (Lyles *et al.* 2008, Draper and Smith 1999).

Flowdiagrammet i figur 4 giver et overblik over beregninger af EC_x. De nærmere detaljer er beskrevet i teksten nedenfor.

Figur 4

Flowdiagram for EC_x-beregning af replikatgennemsnit (længde, vægt eller andel af klækkede æg eller larvedødelighed); flere oplysninger findes i teksten.



Betragtninger om klækkede æg og larvedødelighed

For så vidt angår klækkede æg og larvedødelighed, er det generelt bedst at benytte en faldende model til fitting, medmindre man benytter en probit-modelfitning som beskrevet nedenfor. Dvs. at der bør opstilles en model for andelen af æg, der ikke klækker, eller larver, der dør. Årsagen er, at EC_x henviser til en koncentration, hvor der er en ændring svarende til x % af kontrollernes gennemsnitsrespons. Hvis 5 % af kontrolæggene ikke klækker, og modellen er manglende klækning, henviser EC₂₀ til en koncentration, hvor der er en ændring svarende til 20 % af de 5 % manglende klækning i kontrollen, dvs. en ændring på $0,2 \times 0,05 = 0,01$ eller 1 procentpoint til 6 % manglende klækning. En så lille ændring kan ikke beregnes på en meningsfuld måde ud fra de tilgængelige data og er ikke biologisk vigtig. Hvis der opstilles en model for andelen af æg, der klækker, ville kontrolandelen i dette eksempel være 95 %, og en reduktion på 20 % i forhold til kontrolgennemsnittet ville være en ændring på $0,95 \times 0,2 = 0,18$, dvs. fra en klækningssucces på 95 % til en klækningssucces på 77 % (= 95 – 18), og denne effektkoncentration kan beregnes og er formentlig af større interesse. Dette er ikke et problem med størrelsesmålinger, selv om skadelige virkninger på størrelsen normalt indebærer et fald i størrelsen.

Modeller for størrelse (længde eller vægt) og ægklækningssucces eller larveoverlevelse

Med undtagelse af Brain-Cousens hormetiske model er alle disse modeller beskrevet og anbefalet i OECD (2006). De såkaldte OECD 2-5-modeller drøftes også i forbindelse med økotoksicitetsforsøg i Slob (2002). Der findes selvfølgelig mange andre modeller, som kan være nyttige. Bunke, *et al.* (1999) nævner mange modeller, der ikke er medtaget her, og indeholder mange henvisninger til andre modeller. Dem, der er anført nedenfor, angives som særligt velegnede i forbindelse med økotoksicitetsforsøg, og anvendelse heraf er udbredt.

Med fem testkoncentrationer plus kontrol

- Bruce-Versteeg
- Simpel eksponentiel (OECD 2)
- Eksponentiel med formparameter (OECD 3)
- Simpel eksponentiel med nedre grænse (OECD 4)

Mindst seks testkoncentrationer plus kontrol

- Eksponentiel med formparameter og nedre grænse (OECD 5)
- Michaelis-Menten
- Hill

Hvis der er synlige tegn på hormese (usandsynligt med ægklækningssucces eller larveoverlevelse, men observeres undertiden i størrelsesobservationer)

- Brain-Cousens Hormetic; Brain and Cousens (1989).

Alternative modeller for manglende ægklækning og larvedødelighed

- Modellering af stigende responser kan ske ved fitting af data ved hjælp af probit (eller logistiske) modeller, hvis der ikke er tegn på ekstra-binomial varians, og hvis kontrolforekomsten er estimeret i modelfitningen. Det er ikke den foretrukne metode, eftersom den behandler individet, og ikke replikatet, som analyseenhed (Morgan 1992, O'Hara Hines and Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

En enkelt models grad af egnethed

- Sammenlign observeret og forventet procentvist fald visuelt for hver testkoncentration (Motulsky and Christopoulos 2004, Draper and Smith 1999).

- Sammenlign den gennemsnitlige kvadratafgivelse ved regression med den gennemsnitlige kvadratafgivelse for tilfældig variation ved hjælp af en F-test (Draper and Smith 1999).
- Kontroller, at alle udtryk i modellen er signifikant forskellige fra nul (dvs. bestem, om alle modeludtryk er vigtige) (Motulsky and Christopoulos 2004).
- Diagrammer over residualer fra regression i forhold til testkoncentration, eventuelt i log(konc)-målestok. Der bør ikke være noget mønster i diagrammet; punkterne bør være tilfældigt spredt omkring en vandret linje i en højde på nul.
- Dataene bør vurderes med hensyn til normalitet og varianshomogenitet på samme måde som angivet i tillæg 5.
- Derudover bør residualernes normalitet i forhold til regressionsmodellen vurderes med samme metoder som angivet i tillæg 5 for residualerne fra variansanalysen.

Sammenlign modeller

- Brug Akiakes AICc-kriterier. Lavere AICc-værdier angiver et bedre fit, og hvis $AICc(B) - AICc(A) \geq 10$, er model A næsten altid bedre end model B (Motulsky and Christopoulos (2004)).
- Sammenlign de to modeller visuelt med hensyn til, hvor godt de opfylder ovenstående kriterier for en enkelt model.
- Sparsommelighedsprincippet anbefales, dvs. at den mest enkle model, der i rimeligt omfang er fit til data, anvendes (Ratkowsky 1993, Lyles et. al 2008).

EC_x-beregningens kvalitet

Konfidensintervallet (CI) for EC_x må ikke være for bredt. Der skal anvendes statistiske skøn til at beslutte, hvor bredt konfidensintervallet må være, hvis EC_x-værdien stadig skal kunne bruges. Simuleringer af regressionsmodeller, der er fit til ægglæknings- og størrelsesdata, viser, at konfidensintervaller på ca. 75 % for EC_x (x=10, 20 eller 30) ikke dækker mere end to testkoncentrationer. Dette giver generelle retningslinjer for, hvad der kan accepteres, og praktiske retningslinjer for, hvad der kan lade sig gøre. Flere forfattere bekræfter, at det er nødvendigt at rapportere konfidensintervaller for alle modelparametre, og at brede konfidensintervaller for modelparametre er et tegn på, at modellen ikke er acceptabel (Ott and Longnecker 2008, Alvord and Rossio 1993, Motulsky and Christopoulos 2004, Lyles et al. 2008, Seber and Wild 2003, Bunke et al. 1999, Environment Canada 2005).

Konfidensintervallet for EC_x (eller enhver anden modelparameter) må ikke omfatte nul (Motulsky and Christopoulos 2004). Det er den regression, der svarer til den minimale signifikante forskel, som ofte er nævnt i hypoteseforsøgsmetoder (f.eks. Wang et al. 2000). Det svarer også til det konfidensinterval for gennemsnitlige responser ved LOEC, som ikke omfatter kontrolgennemsnittet. Man må overveje, om parameterestimaterne er videnskabeligt plausible. Hvis konfidensintervallet for y₀ f.eks. er ± 20 %, er intet EC₁₀-estimat plausibelt. Hvis modellen forudsiger en effekt på 20 % ved en koncentration C, og den højeste observerede effekt ved C og lavere koncentrationer er 10 %, er EC₂₀ ikke plausibel (Motulsky and Christopoulos 2004, Wang et al. 2000, Environment Canada 2005).

EC_x må ikke kræve ekstrapolering uden for intervallet af positive koncentrationer (Draper and Smith 1999, OECD 2006). En generel retningslinje kan f.eks. være, at EC_x ikke må ligge mere end ca. 25 % under den laveste koncentration, der testes, eller over den højeste koncentration, der testes.

Henvisninger

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, *Journal of Immunological Methods* 157, 155-163.

Brain P. and Cousens R. (1989); An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed res.* 29: 93-96.

Bunke, O., Droge, B. and Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197-240.

Collett, D. (2002); *Modelling Binary Data*, second edition, Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003); *Modelling Survival Data in Medical Research*, second edition, Chapman and Hall, London.

Draper, N.R. and Smith, H. (1999); *Applied Regression Analysis*, third edition. New York: John Wiley & Sons.

Environment Canada (2005); *Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests*, Report EPS 1/RM/46

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003); *Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples*, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown, and C.R. Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. 2008 November; 29(6): 878–886.

Morgan, B.J.T. (1992); *Analysis of Quantal Response Data*, Chapman and Hall, London.

Motulsky, H., A. Christopoulos (2004); *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting*, Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J. and J. F. Lawless (1993); *Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time*, *Biometrics* Vol. 49, pp. 107-121

OECD (2006); *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application*. Series Testing and Assessment, No. 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis*, sixth edition, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA

Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, *Journal of Industrial Microbiology* 12, 195-199.

Seber, G.A.F., C.J. Wild, *Nonlinear Regression*, Wiley, 2003

Slob W. (2002); Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, 66, 298-312

Wang, Q., D.L. Denton, and R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 19, pp. 113–117, 2000.

C.48 Assay for fisks reproduktion på kort sigt

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledningen (TG) 229 (2012). Behovet for at udvikle og validere et assay med fisk, der kan opspore hormonforstyrrende kemikalier, udspringer af bekymringer om, at kemikaliekoncentrationer i miljøet kan være til skade for både mennesker og dyre- og planteliv som følge af disse kemikaliers interaktion med det endokrine system. I 1998 indledte OECD en højt prioriteret aktivitet med at revidere eksisterende vejledninger og udvikle nye vejledninger for screening og test af potentielt hormonforstyrrende stoffer. Et element i aktiviteten var at udvikle en testvejledning til screening af kemikalier, der påvirker hvirvelløse fiskearters endokrine system. Assayet for fisks reproduktion på kort sigt gennemgik et omfattende valideringsprogram, der omfattede undersøgelser mellem laboratorier med udvalgte kemikalier med henblik på at påvise assayets relevans og pålidelighed for sporing af kemikalier, der påvirker reproduktionen hos fisk via forskellige mekanismer, herunder via det endokrine system (1, 2, 3, 4, 5). Alle endepunkter i OECD-testvejledningen er blevet valideret på tykhovedet elritse, og en delmængde af endepunkter er blevet valideret på japansk risfisk (vitellogenin og sekundære kønskarakteristika) og zebrafisk (vitellogenin). Valideringsarbejdet har været genstand for en peer review foretaget dels af et panel af eksperter udnævnt af the National Coordinators of the Test Guideline Programme (6) (de nationale koordinatore af testvejledningsprogrammet) og dels af et uafhængigt panel af eksperter bestilt af United States Environmental Protection Agency (29) (USA's miljøstyrelse). Assayet er ikke egnet til at identificere specifikke hormonforstyrrende mekanismer, fordi testdyrene har en intakt hypothalamus-hypofyse-gonadeakse (HPG), som kan reagere på kemikalier, der har indvirkning på HPG-aksen på forskellige niveauer.
2. I nærværende forsøgsmetode beskrives et in vivo-screeningssay, hvor kønsmodne hanfisk og gydende hunfisk holdes sammen og eksponeres for et kemikalie i en begrænset del af deres livscyklus (21 dage). Ved afslutningen af eksponeringsperioden på 21 dage måles to biomarkørendepunkter hos hanner og hunner som indikatorer på testkemikaliet's hormonforstyrrende aktivitet; disse endepunkter er vitellogenin og sekundære kønskarakteristika. Vitellogenin måles hos tykhovedet elritse, japansk risfisk og zebrafisk, hvorimod sekundære kønskarakteristika kun måles hos tykhovedet elritse og japansk risfisk. Desuden overvåges den kvantitative frugtbarhed dagligt under hele forsøget. Kønskirtlerne præserveres også, og histopatologien evalueres eventuelt med henblik på at vurdere forsøgsdyrenes formeringsevne og give de øvrige endepunkter større vægt ("weight of evidence").
3. Dette bioassay tjener som et in vivo-screeningssay for formeringsevne, og anvendelsen heraf skal ses i forbindelse med "OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals" (30). I denne konceptramme ligger assayet for fisks reproduktion på kort sigt på niveau 3 som et in vivo-assay, der giver data om en eller flere udvalgte endokrine mekanismer/veje.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

4. Vitellogenin (VTG) produceres normalt i leveren hos æglæggende hvirveldyr (hunner) som respons på cirkulerende endogent østrogen. Det er en præcursor for æggeblomme proteiner, der — når de er produceret i leveren — føres med blodbanen til ovariet, hvor den optages og ændres af de æg, som udvikles. Vitellogenin er stort set ikke-detekterbart i plasma hos umodne hun- og hanfisk, fordi de ikke har tilstrækkeligt cirkulerende østrogen; leveren kan dog syntetisere og udskille vitellogenin som respons på stimulering fra eksogent østrogen.
5. Målingen af vitellogenin benyttes til at afdække kemikalier med forskellige østrogene virkemåder. Afdækning af østrogene kemikalier er mulig gennem måling af vitellogenininduktion i hanfisk, og det er blevet grundigt dokumenteret i den videnskabelige litteratur med peer reviews (f.eks. (7)). Vitellogenininduktion er også påvist efter eksponering for aromatisable androgener (8, 9). En reduktion i niveauet af cirkulerende østrogen hos hunner, f.eks. ved hæmning af aromatasen, der omdanner det endogene androgen til naturligt østrogen 17 β -østradiol, forårsager et fald i VTG-niveauet, som bruges til at påvise, at et givet kemikalie har aromatasehæmmende egenskaber (10, 11). Den biologiske relevans af vitellogeninresponsen efter østrogen-/aromatasehæmning er fastslået og bredt dokumenteret. Det er dog muligt, at produktion af vitellogenin hos hunner også kan påvirkes af generel toksicitet og ikke-endokrine toksiske virkemåder, f.eks. levertoksicitet.

6. Flere målemetoder til rutinebrug er blevet udviklet og standardiseret. Det gælder artsspecifikke enzymkoblede immunadsorptionsteknikker (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)), hvor der bruges immunkemi til kvantificering af VTG produceret i små blod- eller leverprøver indsamlet fra enkeltfisk (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Der udtages prøver af blod fra tykhovedet elritse, blod eller hoved/hale-homogenat fra zebrafisk og lever fra japansk risfisk med henblik på vitellogeninmåling. Hos japansk risfisk er der en god sammenhæng mellem vitellogenin målt fra blod og fra lever (19). Tillæg 6 omhandler de anbefalede procedurer for prøveudtagning til VTG-analyse. Kit til måling af VTG er let tilgængelige; sådanne kit bør være baseret på en valideret artsspecifik ELISA-metode.
7. Sekundære kønskarakteristika for hanner af visse arter er synlige udvendigt, kan kvantificeres og reagerer på cirkulerende niveauer af endogene androgener; det er tilfældet for tykhovedet elritse og japansk risfisk, men ikke for zebrafisk, som ikke har kvantificerbare sekundære kønskarakteristika. Hanner bevarer evnen til at udvikle sekundære kønskarakteristika for hanner, når de eksponeres for androgene kemikalier i vand. Flere undersøgelser i den videnskabelige litteratur dokumenterer denne type respons hos tykhovedet elritse (20) og japansk risfisk (21). Et fald i sekundære kønskarakteristika hos hanner bør fortolkes med forsigtighed på grund af den lave statistiske power og bør være baseret på en ekspertvurdering og vægten af evidens. Der er begrænsninger, for så vidt angår brugen af zebrafisk i dette assay, på grund af fraværet af kvantificerbare sekundære kønskarakteristika, som reagerer på kemikalier med androgene virkninger.
8. Hos tykhovedet elritse er den primære indikator på eksogen androgen eksponering antallet af legevorter på hunfiskens snude. Hos japansk risfisk udgør antallet af papillære strukturer hovedmarkøren for eksogen eksponering for androgene kemikalier hos hunfisk. Tillæg 5A og tillæg 5B indeholder oplysninger om de anbefalede fremgangsmåder til vurdering af kønskarakteristika hos henholdsvis tykhovedet elritse og japansk risfisk.
9. 21-dages assayet med fisk omfatter en vurdering af kvantitativ ægproduktion og præservering af kønskirtlerne med henblik på valgfri histopatologisk undersøgelse. Dette supplerende endepunkt kan være et krav fra visse tilsynsmyndigheder med henblik på en mere fyldestgørende vurdering af forsøgsdyrenes formeringsevne eller i tilfælde, hvor vitellogenin og de sekundære kønskarakteristika ikke reagerer på kemisk eksponering. Selv om nogle endepunkter i høj grad kan være diagnostiske (f.eks. VTG-induktion hos hanfisk og udvikling af vorter hos hunfisk), er ikke alle endepunkter (f. eks. frugtbarhed og histopatologi for kønskirtler) i assayet beregnet til entydigt at identificere specifikke cellulære virkningsmekanismer. I stedet kan man ud fra rækken af endepunkter, samlet set, drage konklusioner om mulige hormonforstyrrende virkninger og dermed udstykke retningslinjer for yderligere forsøg. Selv om endepunktet frugtbarhed ikke er specifikt for hormonforstyrrelser, er det, på grund af sin påviste følsomhed ved kendte hormonforstyrrende kemikalier (5), et vigtigt endepunkt, eftersom man, når dette og andre endepunkter er upåvirkede, i højere grad kan være sikker på, at en forbindelse sandsynligvis ikke er hormonforstyrrende. Når frugtbarheden er påvirket, vil dette endepunkt imidlertid veje tungt i "weight of evidence"-slutninger. Vejledning i fortolkning af data og accept af testresultater findes nedenfor i denne forsøgsmetode.
10. Definitioner anvendt i denne forsøgsmetode er anført i tillæg 1.

PRINCIP FOR TESTEN

11. I assayet eksponeres han- og hunfisk i reproduktiv tilstand sammen i testbeholderne. Deres voksne og reproduktive tilstand gør det muligt klart at skelne mellem kønnene og dermed foretage en kønsrelateret analyse af hvert endepunkt og sikrer, at de er følsomme over for eksogene kemikalier. Ved testens afslutning bekræftes kønnet ved undersøgelse af kønskirtlerne i makroskop efter åbning af abdomen gennem bugen med en saks. Tillæg 2 indeholder en oversigt over de relevante betingelser for bioassayet. Assayet indledes normalt med fisk udtaget fra en bestand i gydningstilstand; der må ikke bruges senescerende dyr. Retningslinjer for

fiskens alder og reproduktive tilstand findes i afsnittet om valg af fisk. Assayet udføres med tre eksponeringskoncentrationer af kemikaliet samt en vandkontrol og om nødvendigt en opløsningsmiddelkontrol. Der bruges to beholdere eller replikater pr. behandling ved zebrafisk (hver beholder indeholder fem hanner og fem hunner). Der bruges fire beholdere eller replikater pr. behandling ved tykhovedet elritse (hver beholder indeholder to hanner og fire hunner). Det sker med henblik på tilpasning til tykhovedet elritse-hannens territoriale adfærd og for samtidig at sikre tilstrækkelig power i assayet. Der bruges fire beholdere eller replikater pr. behandling ved japansk risfisk (hver beholder indeholder tre hanner og tre hunner). Eksponeringen varer 21 dage, og prøveudtagningen af fisk sker på eksponeringens dag 21. Den kvantitative frugtbarhed overvåges dagligt.

12. Ved prøveudtagningen på dag 21 aflives alle dyr på en human måde. Sekundære kønskarakteristika måles hos tykhovedet elritse og japansk risfisk (se tillæg 5A og tillæg 5B); der tages blodprøver til bestemmelse af VTG hos zebrafisk og tykhovedet elritse; alternativt kan hoved/hale indsamles til bestemmelse af VTG hos zebrafisk (tillæg 6); der indsamles lever med henblik på analyse af VTG hos japansk risfisk (tillæg 6); kønskirtlerne fikseres enten hele eller dissekerede med henblik på eventuel histopatologisk evaluering (22).

KRITERIER FOR ACCEPT AF TEST

13. Følgende betingelser skal være opfyldt, for at testens resultater kan godkendes:

- Dødeligheden i vandkontrollerne (eller opløsningsmiddelkontrollerne) må ikke overstige 10 % ved afslutningen af eksponeringsperioden.
- Koncentrationen af opløst ilt skal gennem hele eksponeringsperioden have været mindst 60 % af luftmætningsværdien (ASV).
- Vandtemperaturen må ikke på noget tidspunkt i eksponeringsperioden variere med mere end $\pm 1,5$ °C mellem testbeholderne og må ikke afvige med mere end 2 °C fra de temperaturintervaller, der er specificeret for de arter, der anvendes i testen (tillæg 2).
- Der skal være dokumentation for, at koncentrationerne af testkemikaliet i opløsning på tilfredsstillende måde er holdt inden for ± 20 % af gennemsnittet af de målte værdier.
- Der skal være dokumentation for, at fisken aktivt gyder i alle replikater før eksponering for kemikaliet og i kontrolreplikater under testen.

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

14. Normalt laboratorieudstyr og i særdeleshed følgende:

- a. ilt- og pH-måleudstyr
- b. udstyr til bestemmelse af vandets hårdhed og alkalinitet
- c. egnet apparatur til temperaturkontrol og fortrinsvis kontinuerlig overvågning
- d. beholdere fremstillet af et kemisk inert materiale og med passende kapacitet i forhold til den anbefalede belastningsgrad og bestandtæthed (se tillæg 2)
- e. gydningssubstrat til tykhovedet elritse og zebrafisk; de nødvendige oplysninger findes i tillæg 4.
- f. vægt med tilstrækkelig nøjagtighed (dvs. nøjagtighed på $\pm 0,5$ mg).

Vand

15. Som testvand kan anvendes vand af enhver beskaffenhed, hvori den art, der anvendes i testen, udviser passende langtidsoverlevelse og vækst. Vandets kvalitet skal være ensartet i hele testperioden. Vandets pH skal ligge inden for området fra 6,5 til 8,5, men bør i løbet af en given test ligge inden for et område på $\pm 0,5$ pH-enheder. For at sikre at fortyndingsvandet ikke får urimelig indflydelse på testresultatet (f.eks. ved dannelse af et kompleks med testkemikaliet), skal der regelmæssigt udtages prøver til analyse. Målinger af tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), de vigtigste anioner og kationer (f.eks. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- og SO_4^{2-}), pesticider (f.eks. samlet mængde phosphor- og chlorholdige organiske pesticider), samlet mængde organisk kulstof og opslæmmede faststoffer skal foretages, f.eks. hver tredje måned, såfremt man ved, at fortyndingsvandet har en relativt konstant kvalitet. Hvis vandkvaliteten påviseligt har været konstant over mindst et år, kan analyserne foretages mindre hyppigt og med større intervaller (f.eks. hver sjette måned). I tillæg 3 er anført nogle kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand.

Testopløsninger

16. Testopløsninger med den valgte koncentration fremstilles ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsningen bør fortrinsvis fremstilles ved mekanisk opblanding eller omrystning af testkemikaliet i fortyndingsvandet (f.eks. ved omrøring eller ultralydbehandling). Saturation columns (solubility columns) kan anvendes til fremstilling af en passende koncentreret stamopløsning. Det frarådes at bruge et opløsningsmiddel som bærerstoff. Hvis det er nødvendigt med et opløsningsmiddel, skal der anvendes en parallel opløsningsmiddelkontrol med samme opløsningsmiddelkoncentration som kemikaliebehandlingerne. Ved kemikalier, der er vanskelige at teste, kan et opløsningsmiddel være den teknisk bedste løsning; nærmere oplysninger findes i OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (23). Valget af opløsningsmiddel afgøres af stoffets eller blandingens kemiske egenskaber. OECD's vejledning anbefaler maksimalt 100 µl/l, hvilket skal overholdes. En gennemgang for nylig (24) fremhævede dog yderligere bekymringer i forbindelse med brug af opløsningsmidler til test af hormonforstyrrelser. Det anbefales derfor, at opløsningsmiddelkoncentrationen om nødvendigt minimeres, når det er teknisk muligt (afhængigt af testkemikaliet fysisk-kemiske egenskaber).
17. Der anvendes et testsystem med gennemstrømning. Et sådan system doserer og fortynder kontinuerligt en stamopløsning af testkemikaliet (f.eks. udmålingspumpe, proportional fortynder, mætningssystem), så der afgives en serie af koncentrationer til testbeholderne. Stamopløsningernes og fortyndingsvandets strømnings-hastigheder skal i løbet af testen kontrolleres regelmæssigt, fortrinsvis dagligt, og må ikke variere mere end 10 % gennem hele testforløbet. Der skal udvises forsigtighed, så brugen af plastslanger eller andre materialer af lavere kvalitet undgås, da nogle af dem kan indeholde biologisk aktive kemikalier. Ved valg af materiale til gennemstrømningssystemet bør der tages højde for den eventuelle adsorption af testkemikaliet til dette materiale.

Opbevaring af fiskene

18. Testfisk udvælges fra en laboratoriepopulation, fortrinsvis fra en enkelt bestand, som i mindst to uger forud for testen akklimatiseres under vandkvalitets- og lysbetingelser, som svarer til de i testen anvendte. Det er vigtigt, at belastningsgraden og bestandtætheden (definitioner i tillæg 1) er passende for den fiskeart, der bruges i testen (se tillæg 2).
19. Efter en 48-timers tilpasningsperiode noteres dødeligheden, og der anvendes følgende kriterier:
- dødelighed på over 10 % af populationen efter syv dage: hele fiskegruppen forkastes
 - dødelighed på mellem 5 og 10 % af populationen: akklimatiseringen fortsættes i endnu syv dage; hvis der er mere end 5 % dødelighed i løbet af de følgende syv dage, kasseres hele fiskegruppen
 - dødelighed på mindre end 5 % af populationen på syv dage: fiskegruppen accepteres.
20. Fiskene må ikke behandles for sygdomme i akklimatiseringsperioden, i præeksponeringsperioden eller i eksponeringsperioden.

Præeksponering og valg af fisk

21. Der anbefales en præeksponeringsperiode på 1-2 uger, hvor dyrene anbringes i beholdere svarende til dem, der anvendes i den egentlige test. Fisk fodres ad libitum gennem hele opbevaringsperioden og i eksponeringsfasen. Eksponeringsfasen indledes med seksuelt dimorfe voksne fisk fra en laboratoriepopulation af kønsmodne dyr (f.eks. med tydelige synlige sekundære køns karakteristika hos tykhovedet elritse og japansk risfisk), som er aktivt gydende. Som generel vejledning (og ikke isoleret ud fra observationen af en given fiskegruppes faktiske reproduktive tilstand) bør tykhovedet elritse være ca. 20 (± 2) uger gamle, forudsat at de har været dyrket ved 25 ± 2 °C i hele deres levetid. Japanske risfisk bør være ca. 16 (± 2) uger gamle, forudsat at de har været dyrket ved 25 ± 2 °C i hele deres levetid. Zebrafisk bør være ca. 16 (± 2) uger gamle, forudsat at de har været dyrket ved 26 ± 2 °C i hele deres levetid. Ægproduktion bør vurderes dagligt i præeksponeringsfasen. Det anbefales, at gydningen observeres i alle replikatbeholdere forud for optagelse i assayets eksponeringsfase. Der kan ikke opstilles kvantitative retningslinjer for ønskelig daglig ægproduktion i denne fase, men det er forholdsvis udbredt at observere gennemsnitlige gydninger på > 10 æg/hun/dag for hver art. Der bør anvendes et randomiseret blok-design i forhold til ægproduktionen for at allokere replikater til de forskellige testniveauer for at sikre en afbalanceret fordeling af replikater.

TESTDESIGN

22. Der bruges tre koncentrationer af testkemikaliets, en kontrol og om nødvendigt en opløsningsmiddelkontrol. Dataene kan analyseres for at bestemme statistisk signifikante forskelle mellem behandlings- og kontrolresponsen. Disse analyser bruges i højere grad til at vurdere, om der er brug for yderligere længerevarende test af kemikaliets skadelige virkninger (navnlig overlevelse, udvikling, vækst og reproduktion), end til risikovurdering (25).
23. Når der bruges zebrafisk, udtages der på eksperimentets dag 21 hanner og hunner fra hvert behandlingsniveau (fem hanner og fem hunner i hver af de to replikater) og fra kontrollen/kontrollerne med henblik på måling af vitellogenin. Når der bruges japansk risfisk, udtages der på eksperimentets dag 21 hanner og hunner fra hvert behandlingsniveau (tre hanner og tre hunner i hver af de fire replikater) og fra kontrollen/kontrollerne med henblik på måling af vitellogenin og sekundære køns karakteristika. Når der bruges tykhovedet elritse, udtages der på eksponeringsdagen 21 hanner og hunner (to hanner og fire hunner i hver af de fire replikater) og fra kontrollen/kontrollerne med henblik på måling af vitellogenin og sekundære køns karakteristika. Der skal foretages en kvantitativ vurdering af frugtbarheden, og væv fra kønskirtlerne fikseres enten som helhed eller dissekerede med henblik på eventuel histopatologisk evaluering, om nødvendigt.

Udvælgelse af testkoncentration

24. I denne test fastsættes den højeste testkoncentration til den maksimalt tolererede koncentration (MTC) bestemt ud fra test til bestemmelse af dosisinterval eller andre toksicitetsdata eller 10 mg/l eller den maksimale opløselighed i vand, alt efter hvilken der er lavest. MTC defineres som kemikaliets højeste testkoncentration, der resulterer i en dødelighed på under 10 %. Brugen af denne tilgang forudsætter, at der foreligger eksisterende empiriske data om akut toksicitet eller andre toksicitetsdata, som kan danne grundlag for et skøn over MTC. Det kan være unøjagtigt og kræver normalt en vis faglig vurdering at anslå MTC.
25. Der skal benyttes tre testkoncentrationer med en afstandsfaktor, som ikke overstiger 10, og en fortyndingsvandkontrol (og om nødvendigt en opløsningsmiddelkontrol). Det anbefales at benytte en afstandsfaktor på mellem 3,2 og 10.

FREM GANGSMÅDE

Udvælgelse og vejning af testfisk

26. Det er vigtigt at minimere variationen i fiskenes vægt ved assayets begyndelse. Egnede størrelser for de forskellige fiskearter, der anbefales til brug i denne test, er angivet i tillæg 2. For hele gruppen af fisk, der bruges i testen, gælder det, at området for han- og hunfisks individuelle vægt ved testens begyndelse om muligt bør holdes inden for $\pm 20\%$ af gennemsnitsvægten for det relevante køn. Det anbefales at veje en delprøve af fiskebestanden inden testen for at beregne gennemsnitsvægten.

Eksponeringsbetingelser*Varighed*

27. Testens varighed er 21 dage efter en præeksponeringsperiode. Den anbefalede præeksponeringsperiode er 1-2 uger.

Fodring

28. Fiskene fodres ad libitum med et passende foder (tillæg 2) og tilstrækkeligt ofte til at bevare kropstilstanden. Man må udvise omhu for at undgå mikrobiel vækst og urenheder i vandet. Som hovedregel kan den daglige ration opdeles i to eller tre lige store portioner til flere fodringer om dagen med mindst tre timers interval. En større ration kan accepteres, navnlig i weekender. Fiskene bør ikke fodres i 12 timer inden prøveudtagning/makroskopisk undersøgelse.
29. Fiskefoder evalueres for tilstedeværelse af forurenende stoffer som chlorholdige organiske pesticider, polycykliske aromatiske kulbrinter (PAH) og polychlorerede biphenyler (PCB). Foder med et højt niveau af fytoøstrogener, som ville kompromittere assayets respons på en kendt østrogenagonist (f.eks. østradiol-17b), bør undgås.
30. Foderrester og fækalt materiale skal fjernes fra testbeholderne mindst to gange om ugen f.eks. ved omhyggelig rengøring af bunden i hver enkelt beholder ved hjælp af en sifon.

Lys og temperatur

31. Lysperioderne og vandtemperaturen skal passe til den art, der bruges i forsøget (se tillæg 2).

Hyppighed af analyser og målinger

32. Inden eksponeringsperioden påbegyndes, kontrolleres det, at kemikalietsfølselssystemet fungerer korrekt. Alle de nødvendige analysemetoder skal være fastlagt, herunder tilstrækkeligt kendskab til kemikaliets stabilitet i testsystemet. Under testen bestemmes koncentrationerne af testkemikalie regelmæssigt som følger: Gennemstrømningshastigheden for fortyndingsmidlet og giftstofamopløsningen kontrolleres fortrinsvis dagligt, men som minimum to gange om ugen, og må ikke udvise en variation på mere end 10 % gennem hele testperioden. Det anbefales, at de faktiske testkemikaliekoncentrationer måles i alle beholdere ved testens begyndelse og efterfølgende ugentligt.
33. Det anbefales, at resultaterne baseres på målte koncentrationer. Hvis testkemikaliets koncentration i tilstrækkelig grad har holdt sig inden for $\pm 20\%$ af den nominelle koncentration gennem hele testen, kan resultaterne baseres på enten de nominelle eller de målte værdier.

34. Det kan være nødvendigt at centrifugere eller filtrere prøverne (f.eks. med et filter med en porestørrelse på 0,45 µm). Hvis det er nødvendigt, anbefales centrifugering, men hvis testmaterialet ikke adsorberer på filteret, kan også filtrering accepteres.
35. I løbet af testen skal opløst ilt, temperatur og pH måles i alle testbeholdere mindst en gang om ugen. Samlet hårdhedsgrad og alkalinitet skal måles i kontrolbeholdere og i en beholder med den højeste koncentration mindst en gang om ugen. Temperaturen skal fortrinsvis overvåges kontinuerligt i mindst en testbeholder.

Observationer

36. En række generelle (f.eks. overlevelse) og biologiske responser (f.eks. VTG-niveauer) vurderes i løbet af assayet eller ved afslutningen af assayet. Der skal foretages en kvantitativ overvågning af frugtbarheden dagligt. Måling og evaluering af disse endepunkter og deres anvendelse er beskrevet nedenfor.

Overlevelse

37. Fiskene undersøges dagligt i testperioden, eventuel dødelighed registreres, og den døde fisk fjernes så hurtigt som muligt. Døde fisk erstattes hverken i kontrol- eller testbeholdere. Kønnen for fisk, der dør under testen, bestemmes ved makroskopisk undersøgelse af kønskirtlerne.

Adfærd og udseende

38. Enhver unormal adfærd (i forhold til kontrollerne) registreres; det kan omfatte tegn på generel toksicitet, herunder hyperventilation, ukoordineret svømning, tab af ligevægt og atypisk ubevægelighed eller fouragering. Yderligere ydre abnormaliteter (f.eks. blødning, misfarvning) registreres. Sådanne tegn på toksicitet bør overvejes nøje i forbindelse med fortolkningen af data, da de kan være et tegn på koncentrationer, hvor biomarkører for hormonforstyrrelser ikke er pålidelige. Sådanne adfærdsmæssige observationer kan også være nyttige kvalitative oplysninger som udgangspunkt for eventuelle fremtidige krav til test med fisk. Eksempelvis er der observeret territorial aggressivitet hos normale hanner eller maskuliniserede hunner hos tykhovedet elritse under androgen eksponering; hos zebrafisk reduceres eller hindres den karakteristiske parrings- eller gydningsadfærd efter daggy ved østrogen eller antiandrogen eksponering.
39. Fordi visse aspekter af udseendet (primært farven) kan ændre sig hurtigt ved håndtering, er det vigtigt, at kvalitative observationer foretages, inden dyrene fjernes fra testsystemet. Tidligere erfaringer med tykhovedet elritse tyder på, at visse hormonforstyrrende kemikalier i første omgang kan forårsage ændringer i følgende ydre karakteristika: kropsfarve (lys eller mørk), farvemønstre (lodrette bånd) og kropsform (hoved- og brystområde). Derfor bør fiskenes fysiske udseende observeres i løbet af testen og ved afslutningen af undersøgelsen.

Frugtbarhed

40. Daglige kvantitative observationer af gydning bør registreres pr. replikat. Ægproduktionen registreres som antallet af æg/overlevende hun/dag pr. replikat. Æg fjernes dagligt fra testkamrene. Gydningssubstrater anbringes i testkammeret for tykhovedet elritse og zebrafisk for at sikre, at fiskene kan gyde under normale forhold. Tillæg 4 indeholder nærmere oplysninger om anbefalede gydningssubstrater til zebrafisk (tillæg 4A) og tykhovedet elritse (tillæg 4B). Det anses ikke for nødvendigt at anvende gydningssubstrat til japansk risfisk.

Human aflivning af fisk

41. På dag 21, dvs. ved eksponeringens afslutning, aflives fiskene med passende mængder tricain (tricainmethansulfonat), metacain, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l bufret med 300 mg/l NaHCO₃ (natriumbicarbonat, CAS 144-55-8) for at reducere irritation af slimhinderne; blod eller væv udtages derefter med henblik på bestemmelse af VTG som forklaret i punktet om vitellogenin.

Observation af sekundære kønskarakteristika

42. Visse hormonforstyrrende kemikalier kan forårsage ændringer i specialiserede sekundære kønskarakteristika (antal legevorter hos tykhovedet elritse-hanner, papillære strukturer hos japansk risfisk-hanner). Kemikalier med visse virkemåder kan navnlig forårsage abnormal forekomst af sekundære kønskarakteristika hos dyr af det modsatte køn; eksempelvis kan androgene receptoragonister, som trenbolon, methyldtestosteron og dihydrotestosteron, få tykhovedet elritse-hunner til at udvikle fremtrædende legevorter eller japansk risfisk-hunner til at udvikle papillære strukturer (11, 20, 21). Det er også blevet beskrevet, at østrogenreceptoragonister kan reducere antallet af legevorter og størrelsen af nakkefremspringet hos voksne hanner af arten tykhovedet elritse (26, 27). Sådanne makroskopiske morfologiske observationer kan også være nyttige kvalitative og kvantitative oplysninger som udgangspunkt for eventuelle fremtidige krav til test med fisk. Antallet og størrelsen af legevorter hos tykhovedet elritse og papillære strukturer hos japansk risfisk kan kvantificeres direkte eller mere praktisk hos præservede dyr. Anbefalede fremgangsmåder til evaluering af sekundære kønskarakteristika hos tykhovedet elritse og japansk risfisk findes i henholdsvis tillæg 5A og tillæg 5B.

Vitellogenin (VTG)

43. Blod indsamles fra halearterien/-venen med et hepariniseret mikrohæmatokrit-kapillærrør eller alternativt ved hjertepunktur med en kanyle. Afhængigt af fiskens størrelse kan der generelt indsamles 5-60 µl blod pr. individ hos tykhovedet elritse og 5-15 µl pr. individ hos zebrafisk. Plasma separeres fra blodet ved centrifugering og opbevares med proteaseinhibitorer ved – 80 °C, indtil det skal undersøges for VTG. Alternativt bruges leveren hos japansk risfisk og hoved-/halehomogenat hos zebrafisk som kilde til væv til bestemmelse af VTG (tillæg 6). VTG-målingen skal være baseret på en valideret homolog ELISA-metode, og der skal anvendes en homolog VTG-standard og homologe antistoffer. Det anbefales at bruge en metode, hvor der kan påvises VTG-niveauer så lave som nogle få ng/ml plasma (eller ng/mg væv), som er baggrundsniveauet hos ikke-eksponerede hanfisk.
44. Kvalitetskontrol af VTG-analyse sker ved brug af standarder, blindprøver og mindst duplikate analyser. For hver ELISA-metode gennemføres en test for matrixeffekt (effekt af prøveopløsning) for at bestemme minimumsfaktoren for prøveopløsningen. Hver ELISA-plade, der bruges til VTG-assay, skal omfatte følgende kvalitetskontrolprøver: mindst seks kalibreringsstandarder, som omfatter det forventede interval af VTG-koncentrationer, og mindst en ikke-specifik bindingsassayblindprøve (analyseres i duplikat). Disse blindprøvers absorbans bør være under 5 % af den maksimale kalibreringsstandardabsorbans. Der analyseres mindst to alikvoter (duplikater i brønde) af hver prøveopløsning. Duplikater i brønde, som afviger med mere end 20 %, analyseres igen.
45. Korrelationskoefficienten (R^2) for kalibreringskurverne bør være større end 0,99. En høj korrelation er imidlertid ikke nok til at garantere tilstrækkelig forudsigelse af koncentrationen i alle intervaller. Ud over at have en tilstrækkelig høj korrelation for kalibreringskurven, bør koncentrationen for hver standard, som beregnet på grundlag af kalibreringskurven, være 70-120 % af den nominelle koncentration. Hvis de nominelle koncentrationer afviger fra kalibreringsregressionslinjen (f.eks. ved lavere koncentrationer), kan det være nødvendigt at opdele kalibreringskurven i lave og høje intervaller eller bruge en ikke-lineær model til en passende fitning af absorbansdataene. Hvis kurven er opdelt, bør R^2 for begge linjesegmenter være $> 0,99$.
46. Detektionsgrænsen (LOD) defineres som koncentrationen af den laveste analytiske standard, og kvantificeringsgrænsen (LOQ) defineres som den laveste analytiske standard ganget med den laveste fortyndingsfaktor.
47. På hver dag, hvor der gennemføres VTG-assay, analyseres en spiket prøve, der fremstilles med en reference-standard for assayet (tillæg 7). Forholdet mellem den forventede koncentration og den målte koncentration registreres i rapporten sammen med resultaterne af hvert assaysæt gennemført på den pågældende dag.

Histopatologisk evaluering af kønskirtlerne

48. Tilsynsmyndighederne kan stille krav om en histopatologisk undersøgelse for at undersøge målorganet på HPG-aksen efter eksponering for kemikaliets. I denne henseende fikses kønskirtlerne enten som helhed eller dissekerede. Når der stilles krav om histopatologisk undersøgelse, søges der efter specifikke endokrinrelaterede responser i kønskirtlerne i forbindelse med vurderingen af testkemikaliets hormonforstyrrende virkning. Disse diagnostiske responser omfatter hovedsagelig forekomsten af oocyter i testiklerne, Leydig-cellehyperplasi, reduceret blommedannelse, øgede spermatogonier og perifollikulær hyperplasi. Andre kønskirtellæsioner som oocyttatresi, beskadigelse af testiklerne og fasebetingede ændringer kan have forskellige årsager. I vejledningen om histopatologiske undersøgelser af fisk beskrives de fremgangsmåder, der anvendes til dissekering, fiksering, udtagnings af snit og histopatologisk undersøgelse af kønskirtlerne (22).

DATA OG RAPPORTERING

Evaluering af biomarkørresponser ved variansanalyse (ANOVA)

49. For at identificere et kemikalies potentielle virkning sammenlignes responser for henholdsvis behandlinger og kontrolgrupper ved variansanalyse (ANOVA). Når der bruges en opløsningsmiddelkontrol, udføres en passende statistisk test til sammenligning af fortyndingsvand og opløsningsmiddelkontroller for hvert endepunkt. Vejledning i hvordan data om fortyndingsvand og opløsningsmiddel håndteres i den efterfølgende statistiske analyse, findes i OECD, 2006c (28). Alle data om biologisk respons analyseres og registreres særskilt i rapporten fordelt på køn. Hvis de nødvendige forudsætninger for parametriske metoder ikke er opfyldt — ikke-normalfordeling (f.eks. Shapiro-Wilks test) eller heterogen varians (Bartlett's eller Levenes test) — bør man overveje at transformere dataene for at homogenisere varianserne, inden ANOVA foretages, eller at foretage en vægtet ANOVA. Dunnetts test (parametrisk) på flere parvise sammenligninger eller Mann-Whitney-testen med Bonferroni-justering (ikke-parametrisk) kan bruges til ikke-monotont dosis/respons-forhold. Der kan bruges andre statistiske test (f.eks. Jonckheere-Terpstra-testen eller Williams' test), hvis dosis/respons-forholdet omtrent er monotont. Tillæg 8 indeholder et statistisk flowdiagram, som kan hjælpe med at træffe beslutning om, hvilken statistisk test der er mest egnet. Der kan desuden findes yderligere oplysninger i OECD Document on Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data (28).

Rapportering af testresultater

50. Undersøgelsesdataene skal omfatte:

Testlaboratorium

- Ansvarligt personale og deres undersøgelsesansvar
- Hvert laboratorium skal have dokumenteret kendskab til en række repræsentative kemikalier.

Testkemikalie:

- Karakterisering af testkemikalie
- Fysisk form og relevante fysisk-kemiske egenskaber
- Klargøring af testkoncentrationer: metode og frekvens
- Information om stabilitet og bionedbrydelighed.

Opløsningsmiddel:

- Karakterisering af opløsningsmiddel (form, anvendt koncentration)
- Begrundelse for valg af opløsningsmiddel (hvis andet end vand).

Testdyr:

- Art og stamme
- Leverandør og særlig leverandør
- Fiskens alder ved begyndelsen af testen og reproduktiv tilstand/gydningstilstand
- Oplysninger om procedure for akklimatisering af dyr
- Fiskenes kropsvægt ved eksponeringsperiodens start (fra en delprøve af fiskebestanden).

Testbetingelser:

- Anvendt testprocedure (testtype, belastningsgrad, bestandtæthed osv.)
- Metode til fremstilling af stamopløsning og gennemstrømningshastighed
- De nominelle testkoncentrationer, ugentligt målte koncentrationer af testopløsningerne og anvendte analysemetoder, de målte værdiers gennemsnit og standardafvigelser i testbeholderne samt dokumentation for, at målingerne refererer til testkemikaliet's faktiske koncentration i opløsning
- Fortyndingsvandets karakteristika (herunder pH, hårdhedsgrad, alkalinitet, temperatur, koncentration af opløst ilt, restindhold af chlor, samlet mængde organisk kulstof, opslæmmet tørstof og samtlige andre udførte målinger)
- Vandkvalitet i testbeholderne: pH, hårdhedsgrad, temperatur og koncentration af opløst ilt
- Detaljerede oplysninger om fodring (f.eks. foderets type og kilde samt fodermængde og fodringshyppighed såvel som analyser for relevante kontaminanter, hvis de foreligger (f.eks. PCB'er, PAH'er og organochlorpesticider).

Resultater

- Bevis for, at kontrollerne opfylder testens acceptkriterier
- Data om eventuel dødelighed ved enhver testkoncentration og kontrol
- Anvendte statistiske analyseteknikker, behandling af data og begrundelse for de anvendte teknikker
- Data om biologiske observationer af makromorfologi, herunder sekundære kønskarakteristika, ægproduktion og VTG
- Resultater af dataanalyserne, fortrinsvis i tabelform og grafisk form
- Forekomst af eventuelle usædvanlige reaktioner hos fiskene samt eventuelle synlige virkninger frembragt af testkemikaliet.

VEJLEDNING I FORTOLKNING OG GODKENDELSE AF TESTRESULTATER

51. Denne del beskriver overvejelser, der bør tages i betragtning i forbindelse med fortolkningen af testresultaterne for de forskellige målte endepunkter. Resultaterne bør fortolkes med forsigtighed, når testkemikaliet tilsyneladende forårsager åbenlys toksicitet eller har indvirkning på testdyrets generelle tilstand.
52. Ved fastsættelse af testkoncentrationsintervallet skal det sikres, at den maksimalt tolererede koncentration ikke overskrides, for at give mulighed for en relevant fortolkning af dataene. Det er vigtigt at have mindst en behandling, hvor der ikke er nogen tegn på toksiske virkninger. Tegn på sygdom og tegn på toksiske virkninger bør vurderes nøje og anføres i rapporten. Det er f.eks. muligt, at produktion af VTG hos hunner også kan påvirkes af generel toksicitet og ikke-hormonforstyrrende toksiske virkemåder, f.eks. levertoksicitet. Fortolkningen af virkningerne kan dog styrkes af andre behandlingsniveauer, som ikke konfundes af systemisk toksicitet.

53. Nogle få aspekter skal overvejes, hvis testresultaterne skal godkendes. Som hovedregel skal VTG-niveauerne måles hos kontrolgrupper af hanner og hunner hver for sig og være adskilt med omkring tre størrelsesordener hos tykhovedet elritse og zebrafisk og omkring en størrelsesorden hos japansk risfisk. Eksempler på værdiintervalles i kontrol- og behandlingsgrupperne findes i valideringsrapporterne (1, 2, 3, 4). Høje VTG-værdier hos hanner i kontrollerne kan kompromittere assayets respons og evne til at påvise svage østrogenagonister. Lave VTG-værdier hos hunner i kontrollerne kan kompromittere assayets respons og evne til at påvise aromataseinhibitorer og østrogenagonister. Valideringsundersøgelserne dannede udgangspunkt for vejledningen.
54. Hvad angår beregningen af ægproduktionen, er den forbundet med store forskelle [variationskoefficienten (CV) kan variere fra 20 til 60 %], som påvirker assayets evne til at spore et signifikant fald i ægproduktionen på under 70 %, fordi variationskoefficienten nærmer sig 50 % eller mere. Når variationskoefficienten er begrænset til lavere værdier (ca. 20-30 %), har assayet acceptabel power (80 %) til at spore fald på 40-50 % i ægproduktionen. Testdesignet for tykhovedet elritse, som omfatter fire replikater pr. behandlingsniveau, bør tillægge frugtbarhedsendepunktet større power end ved et testdesign med kun to replikater.
55. Hvis et laboratorium ikke har udført assayet før, eller der er foretaget væsentlige ændringer (f.eks. ny fiskestamme eller leverandør) anbefales det at undersøge dets tekniske kompetence. Det anbefales at bruge kemikalier med en række virkemåder eller indvirkning på en række testendepunkter. I praksis opfordres hvert laboratorium til at opbygge sine egne historiske kontroldata for hanner og hunner og teste et positivt kontrolkemikalie for østrogenaktivitet (f.eks. østradiol-17 β ved 100 ng/l eller en kendt svag agonist), som fører til øget VTG hos hanfisk, et positivt kontrolkemikalie for aromataseinhibering (f.eks. fadrozol eller prochloraz ved 300 μ g/l), som fører til reduceret VTG hos hunfisk, og et positivt kontrolkemikalie for androgen aktivitet (f.eks. trenbolon-17 β ved 5 μ g/l), som fører til induktion af sekundære kønskaraktistika hos tykhovedet elritse- og japansk risfisk-hunner. Alle disse data kan sammenlignes med tilgængelige data fra valideringsundersøgelserne (1, 2, 3), for at sikre at laboratoriet har den fornødne tekniske kompetence.
56. Generelt betragtes VTG-målinger som positive, hvis der er en statistisk signifikant stigning i VTG hos hanner ($p < 0,05$) eller et statistisk signifikant fald hos hunner ($p < 0,05$), som minimum ved den højeste testede dosis, sammenlignet med kontrolgruppen, og hvis der ikke er tegn på generel toksicitet. Et positivt resultat underbygges yderligere af påvisningen af et biologisk sandsynligt forhold mellem dosis- og responskurven. Som nævnt tidligere har faldet i VTG muligvis ikke udelukkende endokrin oprindelse; et positivt resultat bør dog generelt fortolkes som bevis for hormonforstyrrende virkning in vivo og bør normalt give anledning til yderligere afklaring.
57. Histopatologisk undersøgelse af kønskirtlerne kan være et krav fra tilsynsmyndighederne med henblik på at vurdere forsøgsdyrenes formeringsevne og give testresultaterne større vægt ("weight of evidence"). Histopatologisk undersøgelse af kønskirtlerne er måske ikke nødvendig i tilfælde med et positivt resultat for VTG eller sekundære kønskaraktistika (dvs. stigning eller fald i VTG eller induktion af sekundære kønskaraktistika).

LITTERATUR

- 1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, Paris.
- 2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, Paris.
- 3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, Paris.

- (4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. <http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects> (accessed 18/09/08).
- 5) US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.
- 6) OECD (2008). Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, Paris.
- 7) Sumpter J.P. and S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*; 103 Suppl 7:173-8 Review.
- 8) Pawlowski S., *et al.* (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*; 68(3):277-91.
- 9) Andersen L., *et al.* (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*; 76 (3-4):343-52.
- 10) Ankley G.T., *et al.* (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*; 67(1):121-30.
- 11) Panter G.H., *et al.* (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicology*; 70(1):11-21.
- 12) Parks L.G., *et al.* (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 123(2):113-25.
- 13) Panter G.H., *et al.* (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.
- 14) Fenske M., *et al.* (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3): 217-232.
- 15) Holbech H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 130: 119-131
- 16) Rose J., *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 131: 531-539.
- 17) Brion F., *et al.* (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; vol 21: 1699-1708.
- 18) Yokota H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87-98.
- 19) Tatarazako N., *et al.* (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.
- 20) Ankley G.T., *et al.* (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 22(6): 1350-60.

- 21) Seki M, *et al* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23(3):774-81.
 - 22) OECD (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 123, Paris.
 - 23) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris
 - 24) Hutchinson T.H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76; pp.69–92.
 - 25) Hutchinson T.H., *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as “signposts,” not “traffic lights,” in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*; 114 Suppl 1:106-14.
 - 26) Miles-Richardson S.R., *et al.* (1999). Effects of waterborne exposure to 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47, 129-145.
 - 27) Martinovic D., *et al.* (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 478-488.
 - 28) OECD (2006c), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.
 - 29) US EPA (2008), Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay, dated 30 January 2008, US Environmental Protection Agency, Washington DC. 110 pp.
 - 30) OECD (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disruptors*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150, OECD, Paris.
-

Tillæg 1

FORKORTELSER OG DEFINITIONER

Kemikalie: et stof eller en blanding

CV: variationskoefficient

ELISA: enzymkoblet immunadsorptionsteknik

HPG-akse: hypothalamus-hypofyse-gonadeakse

Belastningsgrad: fiskenes vådvægt pr. vandvolumen

MTC: maksimalt tolereret koncentration, som udgør ca. 10 % af LC_{50}

Bestandtæthed: antallet af fisk pr. vandvolumen

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

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

Tillæg 2

TESTBETINGELSER FOR ASSAY TIL SCREENING AF DET ENDOKRINE SYSTEM HOS FISK

1. Anbefalet art	Tykhovedet elritse (<i>Pimephales promelas</i>)	Japansk risfisk (<i>Oryzias latipes</i>)	Zebrafisk (<i>Danio rerio</i>)
2. Testtype	Gennemstrømning	Gennemstrømning	Gennemstrømning
3. Vandtemperatur	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Belysningskvalitet	Fluorescerende pærer (bredspektrede)	Fluorescerende pærer (bredspektrede)	Fluorescerende pærer (bredspektrede)
5. Lysintensitet	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux eller 50-100 ft-c (rumniveauer i laboratoriet)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux eller 50-100 ft-c (rumniveauer i laboratoriet)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux eller 50-100 ft-c (rumniveauer i laboratoriet)
6. Lysperiode (daggry/skumringsovergange er valgfri, men betragtes ikke som nødvendige)	16 t. lys, 8 t. mørke	12-16 t. lys, 12-8 t. mørke	12-16 t. lys, 12-8 t. mørke
7. Belastningsgrad	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Testkammerstørrelse	10 l (minimum)	2 l (minimum)	5 l (minimum)
9. Volumen testopløsning	8 l (minimum)	1,5 l (minimum)	4 l (minimum)
10. Volumenudskiftning af testopløsninger	Mindst 6 dagligt	Mindst 5 dagligt	Mindst 5 dagligt
11. Testorganismers alder	Jf. punkt 21	Jf. punkt 21	Jf. punkt 21
12. Voksne fisks omtrentlige vådvægt (g)	Hunner: 1,5 ± 20 % Hanner: 2,5 ± 20 %	Hunner: 0,35 ± 20 % Hanner: 0,35 ± 20 %	Hunner: 0,65 ± 20 % Hanner: 0,4 ± 20 %
13. Antal fisk pr. testbeholder	6 (2 hanner og 4 hunner)	6 (3 hanner og 3 hunner)	10 (5 hanner og 5 hunner)
14. Antal behandlinger	= 3 (plus passende kontroller)	= 3 (plus passende kontroller)	= 3 (plus passende kontroller)
15. Antal beholdere pr. behandling	Minimum 4	Minimum 4	Minimum 2
16. Antal fisk pr. testkoncentration	16 voksne hunner og 8 hanner (4 hunner og 2 hanner i hver replikatbeholder)	12 voksne hunner og 12 hanner (3 hunner og 3 hanner i hver replikatbeholder)	10 voksne hunner og 10 hanner (5 hunner og 5 hanner i hver replikatbeholder)

17. Fodring	Levende eller frosne saltsøkrebs, voksne eller nauplii, to eller tre gange om dagen (ad libitum), kommercielt tilgængeligt foder eller en kombination af ovenstående	Saltsøkrebs, voksne eller nauplii, to eller tre gange om dagen (ad libitum), kommercielt tilgængeligt foder eller en kombination af ovenstående	Saltsøkrebs, voksne eller nauplii, to eller tre gange om dagen (ad libitum), kommercielt tilgængeligt foder eller en kombination af ovenstående
18. Luftning	Ingen, medmindre DO-koncentration falder under 60 % luftmætning	Ingen, medmindre DO-koncentration falder under 60 % luftmætning	Ingen, medmindre DO-koncentration falder under 60 % luftmætning
19. Fortyndingsvand	Rent overflade- eller brøndvand, rekonstitueret vand eller afkloret ledningsvand	Rent overflade- eller brøndvand, rekonstitueret vand eller afkloret ledningsvand	Rent overflade- eller brøndvand, rekonstitueret vand eller afkloret ledningsvand
20. Præeksponeringsperiode	7-14 dage anbefales	7-14 dage anbefales	7-14 dage anbefales
21. Varighed af eksponering for kemikaliet	21 dage	21 dage	21 dage
22. Biologiske endepunkter	— overlevelse — adfærd — frugtbarhed — sek. kønskarakteristika — VTG — eventuelt histopatologisk undersøgelse af kønskirtler	— overlevelse — adfærd — frugtbarhed — sek. kønskarakteristika — VTG — eventuelt histopatologisk undersøgelse af kønskirtler	— overlevelse — adfærd — frugtbarhed — VTG — eventuelt histopatologisk undersøgelse af kønskirtler
23. Testgodkendelse	Opløst ilt ≥ 60 % af mætning; gennemsnitlig temperatur på 25 ± 2 °C; 90 % overlevelse for fisk i kontrollerne; målte koncentrationer inden for 20 % af de gennemsnitlige målte værdier pr. behandlingsniveau.	Opløst ilt ≥ 60 % af mætning; gennemsnitlig temperatur på 25 ± 2 °C; 90 % overlevelse for fisk i kontrollerne; målte koncentrationer inden for 20 % af de gennemsnitlige målte værdier pr. behandlingsniveau.	Opløst ilt ≥ 60 % af mætning; gennemsnitlig temperatur på 26 ± 2 °C; 90 % overlevelse for fisk i kontrollerne; målte koncentrationer inden for 20 % af de gennemsnitlige målte værdier pr. behandlingsniveau.

Tillæg 3

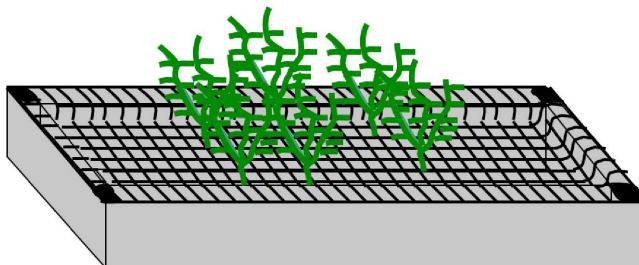
KEMISKE EGENSKABER FOR ACCEPTABELT FORTYNDINGSVAND

KOMPONENT	KONCENTRATIONER
Partikler	< 20 mg/l
Organisk kulstof i alt	< 2 mg/l
Ikke-ioniseret ammoniak	< 1 µg/l
Residualt chlor	< 10 µg/l
Organiske fosforpesticider i alt	< 50 µg/l
Chlorerede organiske pesticider + polychlorbiphenyler i alt	< 50 µg/l
Organisk chlor i alt	< 25 ng/l

Tillæg 4A

GYDNINGSSUBSTRAT TIL ZEBRAFISK

Gydningsbakke: instrumentbakke af glas, f.eks. $22 \times 15 \times 5,5$ cm (l $\times$ b $\times$ d), dækket med et aftageligt rustfrit metalgitter (maskebredde 2 mm). Gitteret bør dække instrumentbakkens åbning på et niveau under kanten.



Gydningssubstratet fastgøres på gitteret. Det skal fungere som en struktur, fisken kan bevæge sig ind i. Syntetiske akvarieplanter fremstillet af grønt plastmateriale er f.eks. egnede (NB: eventuel adsorption af testkemikaliet til plastmaterialet bør overvejes). Plastmaterialet bør være udvasket i et tilstrækkeligt volumen varmt vand, til at sikre at ingen kemikalier kan afgives til testvandet. Ved brug af glasmaterialer sikres det, at fiskene hverken skades eller sidder fast i forbindelse med deres kraftige aktivitet.

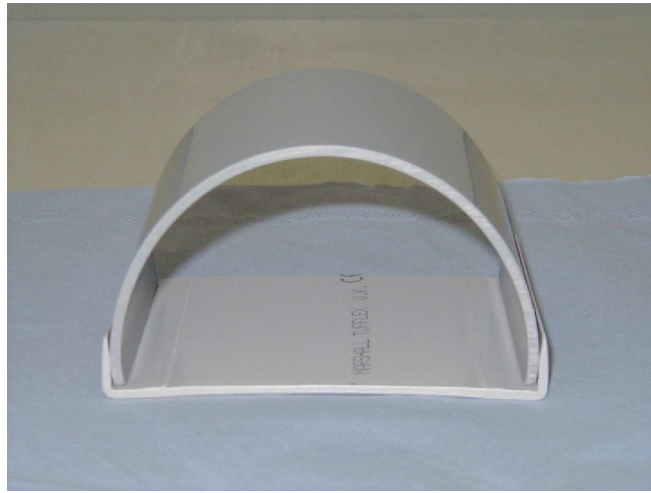
Afstanden mellem bakken og glaspladen bør være mindst 3 cm, for at sikre at gydningen ikke sker uden for bakken. De æg, der lægges på bakken, falder gennem gitteret og kan udtages 45-60 min. efter belysningens start. De gennemsigtige æg er ikke-klæbende og kan let tælles med tværgående lys. Når der bruges fem hunner pr. beholder, kan et antal æg på op til 20 om dagen betragtes som lavt, op til 100 som middel og over 100 som højt. Gydningsbakken fjernes, æggene indsamles, og gydningsbakken anbringes i testbeholderen igen, enten så sent som muligt om aftenen eller meget tidligt om morgenen. Bakken skal anbringes senest efter en time, da gydningssubstratet ellers kan forårsage individuel parring og gydning på et usædvanligt tidspunkt. Hvis situationen kræver, at gydningsbakken anbringes senere, skal det ske mindst ni timer efter belysningens start. På dette sene tidspunkt på dagen induceres gydning ikke længere.

Tillæg 4B

GYDNINGSSUBSTRAT TIL TYKHOVEDET ELRITSE

To eller tre kombinerede gydningssfliser og bakker af plast/keramik/glas eller rustfrit stål anbringes i hvert testkammer (f.eks. 80 mm lang grå halvcirkelformet rende på en 130 mm lang bakke med kanter) (se billede). Korrekt tørrede PVC-fliser eller keramikfliser har vist sig at være egnede til at modtage et gydningssubstrat (Thorpe et al., 2007).

Det anbefales, at fliserne slibes for at fremme adhæsion. Bakken bør desuden afskærmes for at hindre fiskenes adgang til de nedfaldne æg, medmindre det har vist sig, at æg klæber til det anvendte gydningssubstrat.



Bunden er udformet, så den indeholder eventuelle æg, der ikke klæber til flisens overflade og derfor falder ned i bunden af beholderen (eller de æg, der lægges direkte på den flade plastbund). Alt gydningssubstrat bør udvaskes i mindst 12 timer i fortyndingsvand inden brug.

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology*, 81, 90–98.

Tillæg 5A

VURDERING AF SEKUNDÆRE KØNSKARAKTERISTIKA HOS TYKHØVEDET ELRITSE MED HENBLIK PÅ PÅVISNING AF VISSE HORMONFORSTYRENDE KEMIKALIER**Oversigt**

Potentielt vigtige udseenderelaterede karakteristika hos voksne fisk af arten tykhovedet elritse i test til påvisning af hormonforstyrrende stoffer omfatter kropsfarve (lys/mørk), farvemønstre (tilstedeværelse eller fravær af lodrette bånd), kropsform (hoved- og brystområde, udvidet abdomen) og specifikke sekundære kønskarakteristika (antal og størrelse af legevorter, størrelse af nakkefremspring og æglægningsorgan).

Legevorter befinder sig på hovedet (nakkefremspringet) hos formeringsaktive tykhovedet elritse-hanner og er sædvanligvis arrangeret i et bilateralt symmetrisk mønster (Jensen et al., 2001). Hunner og afkom af hankøn og hunkøn i kontrollerne udvikler ikke vorter (Jensen et al., 2001). Der kan være op til otte individuelle vorter omkring hannernes øjne og mellem næseborene. Det største antal og de største vorter befinder sig i to parallelle linjer umiddelbart under næseborene og omkring munden. Hos mange fisk er der grupper af vorter under underkæben; dem, der er tættest på munden, forekommer som regel som et enkelt par, mens sættet tættere på bugen kan bestå af op til fire vorter. Det faktiske antal vorter er sjældent højere end 30 (interval: 18-28; Jensen et al., 2001). De fremherskende vorter (for så vidt angår antal) er til stede som en enkelt, relativt rund struktur med en højde omtrent svarende til radius. De fleste formeringsaktive hanner har også, i det mindste nogle, vorter, som er så forstørrede og fremtrædende, at de ikke kan skelnes som individuelle strukturer.

Visse typer hormonforstyrrende kemikalier kan forårsage abnormal forekomst af visse sekundære kønskarakteristika hos det modsatte køn; androgenreceptoragonister, såsom methyltestosteron-17 α eller trenbolon-17 β , kan f.eks. få tykhovedet elritse-hunner til at udvikle legevorter (Smith, 1974; Ankley et al., 2001; 2003), mens østrogenreceptoragonister kan mindske antallet eller størrelsen af legevorter hos hanner (Miles-Richardson et al., 1999; Harries et al., 2000).

Nedenfor beskrives karakteriseringen af legevorter hos tykhovedet elritse baseret på fremgangsmåder brugt i U.S. Environmental Protection Agency's laboratorium i Duluth, MN. Specifikke produkter og/eller specifikt udstyr kan erstattes med tilgængelige sammenlignelige alternativer.

Observation opnås bedst med et forstørrelsesglas med lys eller et 3X-dissektionsmikroskop med lys. Observer fisken fra ryggen og med forenden fremad (hoved mod objektivet).

- Anbring fisken i en lille petriskål (f.eks. 100 mm i diameter) med forenden fremad og bugen nedad. Fokuser med søgeren for at identificere vorterne. Rul forsigtigt og langsomt fisken fra side til side for at identificere områder med vorter. Tæl og scor vorterne.
- Gentag observationen for den ventrale overflade af hovedet ved at anbringe fisken på ryggen med forenden fremad i petriskålen.
- Observationer skal være afsluttet inden for to minutter pr. fisk.

Tælling og vurdering af vorter

Der er identificeret seks områder for vurdering af tilstedeværelsen og udviklingen af vorter hos voksen tykhovedet elritse. Der er udviklet en model for kortlægning af placering af og antal vorter (se sidst i dette tillæg). Antallet af vorter registreres, og deres størrelse kan kvantitativt vurderes som følger: 0 — fraværende, 1 — tilstedeværende, 2 — forstørret og 3 — udtalt for hver organisme (figur 1).

Score 0 — fravær af vorter. Score 1 — tilstedeværelse af vorter; identificeres som vorter med et enkelt punkt, hvis højde stort set svarer til dets radius. Score 2 — forstørret vorte; identificeres som væv, der ligner en asterisk, normalt med en stor radial base med fordybninger ud fra midten. Vorten er ofte mere forrevet, men kan undertiden være en smule afrundet. Score 3 — udtalt vorte; er normalt ret stor og afrundet med mindre defineret struktur. Vorterne løber nogle gange sammen og danner en enkelt masse i et område eller en kombination af områder (B, C og D, beskrevet nedenfor). Farve og mønster ligner score 2, men kan være forholdsvis vilkårligt. Med dette vurderingssystem opnås normalt en samlet score for vorter på < 50 hos en normal han i kontroller med 18-20 vorter (Jensen et al., 2001).

Figur 1



Det faktiske antal vorter kan hos nogle fisk være større end antallet af kasser i modellen for et givet vurderingsområde. Yderligere vurderingstal kan i givet fald markeres i, til højre for eller til venstre for kassen. Modellen skal således ikke nødvendigvis være symmetrisk. En anden teknik til kortlægning af vorter, som er parret eller hænger sammen lodret langs mundens vandrette plan, er dobbeltmarkering af to vortevurderingspunkter i en enkelt kasse.

Kortlægningsområder:

A — Vorter omkring øjnene. Kortlagt fra ryg mod bug omkring øjnenes forkant. Almindeligvis flere hos modne hanner i kontroller, ikke til stede hos hunner i kontroller, generelt parret (en ved hvert øje) eller enkeltvis hos hunner, der eksponeres for androgener.

B-Vorter mellem næsebor (porer, sensorisk kanal). Normalt i par hos hanner i kontroller ved højere udviklingsniveauer (2 — forstørret eller 3 — udtalt). Ikke til stede hos hunner i kontroller med en vis forekomst og udvikling hos hunner, der eksponeres for androgener.

C — Vorter umiddelbart foran næseborene, parallelt med munden. Generelt forstørrede eller udtalte hos hanner i kontroller. Til stede eller forstørrede hos mindre udviklede hanner eller androgenbehandlede hunner.

D — Vorter parallelt langs mundlinjen. Vurderes generelt som udviklede hos hanner i kontroller. Fraværende hos hunner i kontroller, men til stede hos hunner, der eksponeres for androgener.

E — Vorter på underkæben, tæt på munden, normalt små og sædvanligvis i par. Varierende hos hanner i kontroller eller behandlede hanner og hos behandlede hunner.

F — Vorter ventralt i forhold til E. Normalt små og i par. Tilstedeværende hos hanner i kontroller og hos hunner, der eksponeres for androgener.

HENVISNINGER

- 1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.
- 2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17- β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.
- 3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 34:3003-3011.

- 4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.
- 5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.
- 6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 47:129-145.
- 7) Smith RJF. 1974. Effects of 17 α -methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can J Zool* 52:1031-1038.

Vortemodel:

ID _____

Dato _____

Score i alt _____

Numerisk score

1 – tilstedeværende

2 – forstørret

3 – udtalt

	A	X1	X1	X1	X1

	B	X1	X1	X1	X1

	C	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
	D	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1

		E	X1	X1	
	F	X1	X1	X1	X1

Tillæg 5B

VURDERING AF SEKUNDÆRE KØNSKARAKTERISTIKA HOS JAPANSK RISFISK MED HENBLIK PÅ PÅVISNING AF VISSE HORMONFORSTYRENDE KEMIKALIER

Nedenfor findes en beskrivelse af målingen af papillære strukturer (*), som er de sekundære kønskarakteristika hos japansk risfisk (*Oryzias latipes*).

- 1) Efter udskæring af leveren (tillæg 6) anbringes kadaveret i et konisk rør, som indeholder ca. 10 ml 10 % neutralt bufret formalin (opad: hoved, nedad: hale). Hvis kønskirtlen er fikseret i andet end 10 % neutralt bufret formalin, foretages et tværsnit på tværs af kadaveret mellem den forreste del af gatfinnen og anus med en skalpel, idet det omhyggeligt undgås at skade kønsåbningen og selve kønskirtlen (figur 3). Anbring kraniesiden af fiskekroppen i fikseringsopløsningen for at præservere kønskirtlen og halesiden af fiskekroppen i 10 % neutralt bufret formalin som beskrevet ovenfor.
- 2) Når fiskekroppen er anbragt i 10 % neutralt bufret formalin, gribes den forreste del af gatfinnen med en pincet og holdes bøjet i omkring 30 sekunder for at holde gatfinnen åben. Når gatfinnen gribes med pincetten, tager man forsigtigt fat i nogle få finnestråler i den forreste del for ikke at ridse de papillære strukturer.
- 3) Når gatfinnen har været holdt åben i omkring 30 sekunder, opbevares fiskekroppen i 10 % neutralt bufret formalin ved stuetemperatur indtil måling af de papillære strukturer (måling bør foretages efter fiksering i mindst 24 timer).

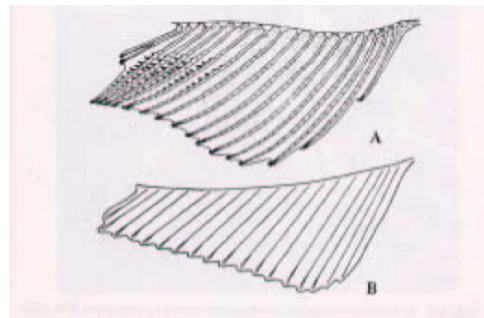
Måling

- 1) Når fiskekroppen har været fikseret i 10 % neutralt bufret formalin i mindst 24 timer, opsamles fiskekadaveret fra det koniske rør, og formalinet tørres af med filterpapir (eller en papirserviet).
- 2) Anbring fisken med abdomen opad. Afskær derefter forsigtigt gatfinnen med en lille dissektionssaks (det foretrækkes, at en smule pterygiophor afskæres sammen med gatfinnen).
- 3) Grib den forreste del af den afskårne gatfinne med en pincet, og anbring den på en glasplade med flere dråber vand. Dæk derefter gatfinnen med et dækglas. Det er vigtigt ikke at ridse de papillære strukturer, når man griber gatfinnen med pincetten.
- 4) Tæl antallet af ledskiver med papillære strukturer ved hjælp af tælleren i et biologisk mikroskop (opretstående mikroskop eller omvendt mikroskop). De papillære strukturer genkendes, når en lille formation af strukturer er synlig på bagkanten af ledskiven. Registrer antallet af ledskiver med papillære strukturer i hver finnestråle på arbejdsarket (f.eks. første finnestråle: 0, anden finnestråle: 10, tredje finnestråle: 12 osv.), og indtast summen i Excel-arket for hver fisk. Tag om nødvendigt et billede af gatfinnen, og tæl antallet af ledskiver med papillære strukturer på billedet.
- 5) Efter målingen anbringes gatfinnen i det koniske rør, der er beskrevet i (1), og opbevares.

(*) Papillære strukturer ses normalt kun hos voksne hanner og observeres på finnestråler fra den anden til den syvende eller ottende talt fra den bageste ende af gatfinnen (figur 1 og 2). Strukturene forekommer dog sjældent på den første finnestråle fra den bageste ende af gatfinnen. Denne standardprocedure omfatter måling af strukturer på den første finnestråle (i denne standardprocedure henviser finnestrålenummeret til rækkefølgen fra den bageste ende af gatfinnen).

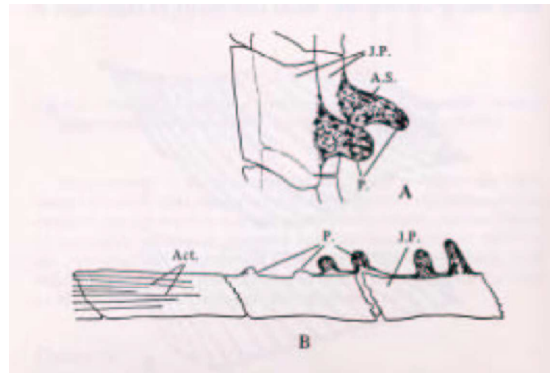
Figur 1.

Diagram, der viser kønsforskelle i gatfinns form og størrelse. A, han; B, hun. T. B. Oka (1931), On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



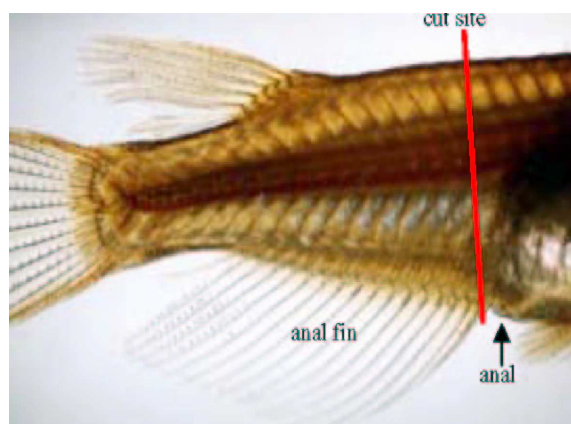
Figur 2.

A — Strukturer på gatfinnes ledskiver. J.P. (joint plate): ledskive; A.S. (axial space): aksial afstand; P. (process): struktur. B — Finnestråles distale ekstremitet. Actinotrichia (Act.) er på spidsen. T. B. Oka (1931), On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



Figur 3.

Billede af fiskekrop, der viser det sted, hvor der skal skæres, når kønskirtlen er fikseret i en anden fikseringsopløsning end 10 % neutralt bufret formalin. I givet fald afskæres den resterende del af kroppen mellem den forreste del af gatfinnen og anus med en skalpel (rød streg). Hovedsiden af fiskens krop anbringes i fikseringsopløsningen til kønskirtlen, og halesiden af fiskekroppen anbringes i 10 % neutralt bufret formalin.



Tillæg 6

ANBEFALEDE PROCEDURER FOR PRØVEUDTAGNING TIL VITELLOGENINANALYSE

Det sikres, at der ikke forekommer krydskontamination mellem VTG-prøver fra hanner og hunner.

Fremgangsmåde 1A: Tykhovedet elritse, indsamling af blod fra halevenen/-arterien

Efter bedøvelse afskæres haleroden delvist med en skalpel, og blod indsamles fra halevenen/-arterien med et hepariniseret mikrohæmatokrit-kapillærrør. Når blodet er indsamlet, isoleres plasma hurtigt ved centrifugering i 3 minutter ved 15 000 g (eller alternativt i 10 minutter ved 15 000 g ved 4 °C). Om ønsket kan hæmatokritprocenten bestemmes efter centrifugering. Plasmadelen fjernes derefter fra mikrohæmatokritrøret og opbevares i et centrifugeglas med 0,13 enheder aprotinin (en proteaseinhibitor) ved – 80 °C, indtil VTG kan bestemmes. Afhængigt af størrelsen af den tykhovedede elritse (som er kønsbestemt) kan der generelt indsamles et plasmavolumen på 5-60 mikroliter pr. fisk (Jensen et al., 2001).

Fremgangsmåde 1B: Tykhovedet elritse, indsamling af blod fra hjertet

Alternativt kan blod indsamles ved hjertepunktur med en hepariniseret kanyler (1 000 enheder heparin pr. ml). Blodet overføres til Eppendorf-rør (holdt på is) og centrifugeres (5 min., 7 000 g, stuetemperatur). Plasmaet overføres til rene Eppendorf-rør (i aliquoter, hvis plasmavolumenet tillader det) og nedfryses omgående ved – 80 °C, indtil det skal analyseres (Panter et al., 1998).

Fremgangsmåde 2A: Japansk risfisk, udskæring af leveren hos japansk risfisk

Fjernelse af testfisken fra testkammeret

- 1) Testfisk fjernes fra testkammeret med et lille fiskenet. Undgå at tabe testfisken ned i andre testkamre.
- 2) Testfisk skal principielt fjernes i følgende rækkefølge: kontrol, opløsningsmiddelkontrol (når det er relevant), laveste koncentration, middelkoncentration, højeste koncentration og positiv kontrol. Derudover bør alle hanner fjernes fra et testkammer, før de resterende hunner fjernes.
- 3) Hver testfisks køn identificeres ud fra ydre sekundære kønskarakteristika (f.eks. gatfinnens form).
- 4) Anbring testfisken i en transportbeholder, og bær den til arbejdsstationen med henblik på udskæring af leveren. Kontroller, at etiketterne på testkammeret og transportbeholderen er korrekte, og at antallet af fisk, der er blevet fjernet fra testkammeret, og antallet af fisk, som er tilbage i testkammeret, er som forventet.
- 5) Hvis kønnet ikke kan identificeres ud fra fiskens ydre udseende, fjernes alle fisk fra testkammeret. I givet fald identificeres kønnet ved observation af kønskirtlen eller sekundære kønskarakteristika under stereoskopisk mikroskop.

Udskæring af leveren

- 1) Overfør testfisken fra transportbeholderen til opløsningen med anæstetikum ved hjælp af det lille fiskenet.
- 2) Når testfisken er bedøvet, overføres den til filterpapir (eller en papirserviet) med en almindelig pincet. Når testfisken gribes, bruges pincetten til at tage fat på hver side af hovedet, så halen ikke går i stykker.
- 3) Tør vandet af testfiskens overflade med filterpapiret (eller papirservietten).

- 4) Anbring fisken med abdomen opad. Foretag derefter et lille tværsnit halvvejs mellem den ventrale nakkeregion og den midterste del af bugen med en dissektionssaks.
- 5) Indfør dissektionssaksen i det lille snit, og foretag et snit i abdomen fra et punkt bag gælleklappen til den forreste del af anus langs abdomens midterlinje. Dissektionssaksen må ikke føres for dybt ind, da man risikerer at skade leveren og kønskirtlen.
- 6) Foretag følgende operationer under et stereoskopisk mikroskop.
- 7) Anbring testfisken med abdomen opad på papirservietten (petriskål af glas eller objektglas er også en mulighed).
- 8) Udvid bughulens vægge med en præcisionspincet, og blotlæg de indre organer. Det er også acceptabelt om nødvendigt at blotlægge de indre organer ved at fjerne den ene side af bughulevæggen.
- 9) Blotlæg den forbundne del af leveren og galdeblæren med en anden præcisionspincet. Grib galdegangen, og afskær galdeblæren. Sørg for ikke at ødelægge galdeblæren.
- 10) Grib spiserøret, og afskær mave-tarm-kanalen fra leveren på samme måde. Sørg for, at indholdet i mave-tarm-kanalen ikke flyder ud. Afskær den bageste del af mave-tarm-kanalen fra anus, og fjern kanalen fra bughulen.
- 11) Fjern fedtmassen og andet væv fra leverens periferi. Sørg for ikke at ridse leveren.
- 12) Grib området ved den hepatiske portal med en præcisionspincet, og fjern leveren fra bughulen.
- 13) Anbring leveren på objektglasset. Eventuelt yderligere fedt og udefrakommende væv (f.eks. laget omkring bugen) fjernes fra leverens overflade.
- 14) Mål leverens vægt med et 1,5 ml mikrorør som tara med en elektronisk analysevægt. Registrer værdien på arbejdsarket (aflæsning: 0,1 mg). Bekræft identifikationsinformationen på mikrorørets etiket.
- 15) Luk låget på det mikrorør, der indeholder leveren. Opbevar det på et kølestativ (eller isstativ).
- 16) Efter udskæringen af en lever rengøres dissektionsinstrumenterne eller erstattes med rene instrumenter.
- 17) Fjern leverne fra alle fiskene i transportbeholderen som beskrevet ovenfor.
- 18) Når leverne er skåret ud af alle fisk i transportbeholderen (dvs. alle hanner eller hunner i et testkammer), anbringes alle leverprøver i et reagensglasstativ med en identifikationsetiket og opbevares i en fryser. Når leverne gives til forbehandling kort efter udskæringen, bæres prøverne til den næste arbejdsstation på et kølestativ (eller isstativ).

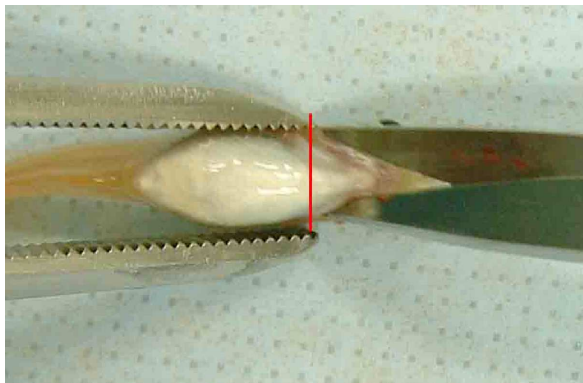
Efter udskæring af leveren kan fiskekadaveret anvendes til histologisk undersøgelse af kønskirtlerne og måling af sekundære køns karakteristika.

Prøveemne

Opbevar leverprøver udtaget fra testfisken ved $\leq -70\text{ }^{\circ}\text{C}$, hvis de ikke bruges til forbehandling kort efter udskæringen.

Figur 1

Der foretages et snit lige foran brystfinnerne med en saks.



Figur 2

Der foretages et snit langs midterlinjen af abdomen til et punkt ca. 2 mm foran anus.

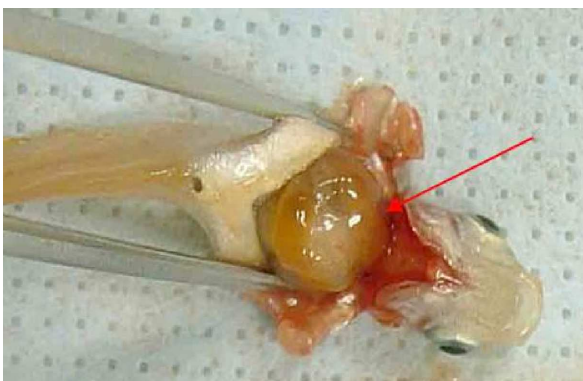


Figur 3

Bugvæggene spredes med pincet for at blottlægge leveren og andre indre organer.

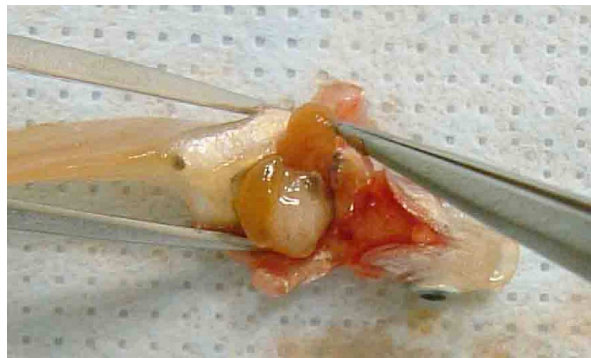
(Alternativt hæftes bugvæggene op lateralt).

Pilen angiver leveren.



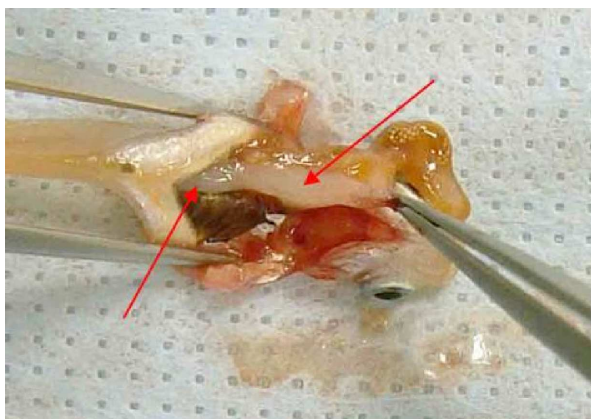
Figur 4

Leveren dissekeres stumpt og udtages med pincet.



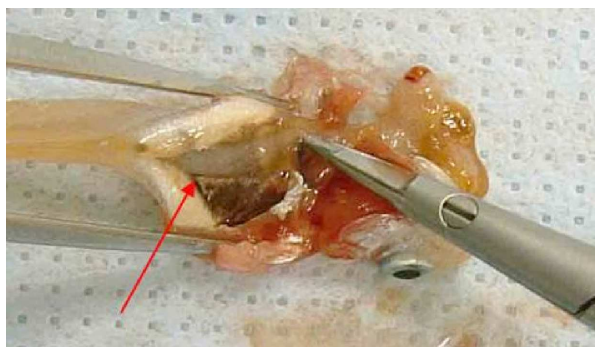
Figur 5

Indvoldene tages forsigtigt ud med pincet.



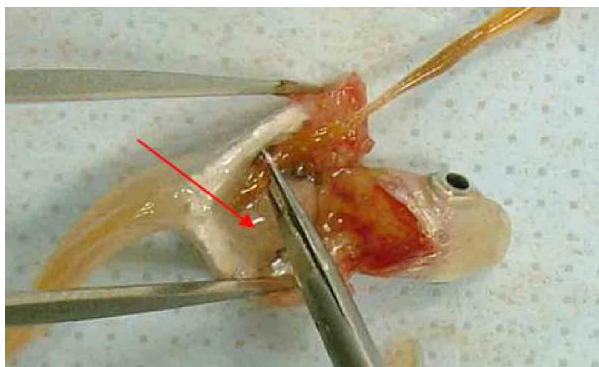
Figur 6

Begge ender af indvoldene og eventuelle tilknyttede mesenteriske strukturer afskæres med saks.



Figur 7 (hun)

Proceduren er identisk for hundyr.



Figur 8

Den afsluttede procedure.



Fremgangsmåde 2B: Japansk risfisk (*Oryzias latipes*), forbehandling af lever med henblik på vitellogeninanalyse

Tag kolben med homogenatbuffer fra ELISA-kittet, og afkøl den med knust is (opløsningens temperatur: $\leq 4^{\circ}\text{C}$). Hvis der bruges homogenatbuffer fra EnBio ELISA-systemet, optøs opløsningen ved stuetemperatur, og kolben afkøles med knust is.

Beregn volumen af homogenatbuffer til leveren på grundlag af dens vægt (tilsæt 50 μl homogenatbuffer pr. mg lever). Hvis leveren f.eks. vejer 4,5 mg, skal der bruges 225 μl homogenatbuffer til leveren. Udarbejd en liste over homogenatbuffervolumen for alle lever.

Klargøring af leveren til forbehandling

- 1) Tag 1,5 ml-mikrorøret, der indeholder leveren, ud af fryseren umiddelbart inden forbehandlingen.
- 2) Forbehandling af leveren fra hanner bør foretages før forbehandlingen af leveren fra hunner for at forhindre vitellogeninkontaminering. Forbehandlingen til testgrupperne bør desuden foregå i følgende rækkefølge: kontrol, opløsningsmiddelkontrol (når det er relevant), laveste koncentration, middeldkoncentration, højeste koncentration og positiv kontrol.

- 3) Antallet af 1,5 ml-mikrorør, som indeholder leverprøver taget fra fryseren, må på et givet tidspunkt ikke overstige det antal, der kan centrifugeres på det pågældende tidspunkt.
- 4) Arranger 1,5 ml-mikrorørene med leverprøverne i samme rækkefølge som prøvenummeret på isstativet (det er ikke nødvendigt at optø leveren).

Udførelse af forbehandlingen

1) Tilsætning af homogenatbufferen

Se på listen, hvilket homogenatbuffervolumen der skal bruges til en specifik leverprøve, og juster mikropipetten (volumeninterval: 100-1 000 µl) til det rette volumen. Sæt en ren spids på mikropipetten.

Tag homogenatbufferen fra reagensglasset, og tilsæt bufferen til 1,5 ml-mikrorøret med leveren.

Tilsæt homogenatbuffer til alle 1,5 ml-mikrorør med lever i henhold til ovennævnte procedure. Det er ikke nødvendigt at sætte en ny spids på mikropipetten. Hvis spidsen er kontamineret eller mistænkes for at være det, skal den dog udskiftes.

2) Homogenisering af leveren

- Sæt en ny støder på homogenisatoren med henblik på homogenisering.
- Indfør støderen i 1,5 ml-mikrorøret. Hold homogenisatoren, således at leveren presses mellem støderens overflade og mikrorørets indervæg.
- Kør homogenisatoren i 10-20 sekunder. Afkøl mikrorøret med knust is under operationen.
- Løft støderen op af mikrorøret, og hold den stille i omkring ti sekunder. Undersøg derefter suspensionens tilstand visuelt.
- Hvis stykker af lever observeres i suspensionen, gentages trin (3) og (4) for at fremstille et tilfredsstillende leverhomogenat.
- Afkøl det opslæmmede leverhomogenat på isstativet indtil centrifugering.
- Udskift støderen for hvert homogenat.
- Homogeniser alle lever med homogenatbuffer i henhold til ovennævnte procedure.

3) Centrifugering af det opslæmmede leverhomogenat

- Kontroller, at temperaturen i det afkølede centrifugekammer er på $\leq 5^{\circ}\text{C}$.
- Indsæt 1,5 ml-mikrorørene med det opslæmmede leverhomogenat i den afkølede centrifuge (juster om nødvendigt balancen).
- Centrifuger det opslæmmede leverhomogenat ved 13 000 g i 10 min. ved $\leq 5^{\circ}\text{C}$. Hvis supernatanterne er tilstrækkeligt separeret, kan centrifugalkraften og tiden dog justeres efter behov.
- Efter centrifugeringen kontrolleres det, at supernatanterne er tilstrækkeligt separeret (overflade: fedtstoffer, mellemlag: supernatant, nederste lag: levervæv). Hvis separationen ikke er tilstrækkelig, centrifugeres suspensionen igen under samme betingelser.
- Fjern alle prøver fra den afkølede centrifuge, og arranger dem i samme rækkefølge som prøvenummeret på isstativet. Sørg for ikke at resuspendere de enkelte separerede lag efter centrifugeringen.

4) Indsamling af supernatanten

- Anbring fire 0,5 ml-mikrorør til opbevaring af supernatanten i reagensglasstativet.
- Indsaml 30 µl af hver supernatant (separeret som det mellemliggende lag) med mikropipetten, og fyld det i et 0,5 ml-mikrorør. Sørg for ikke at indsamle fedtstoffet på overfladen eller levervævet i det nederste lag.
- Indsaml supernatanten, og fyld den i to andre 0,5 ml-mikrorør på samme måde som beskrevet ovenfor.
- Indsaml resten af supernatanten med mikropipetten (om muligt: ≥ 100 µl). Fyld derefter supernatanten i det sidste mikrorør. Sørg for ikke at indsamle fedtstoffet på overfladen eller levervævet i det nederste lag.
- Luk mikrorørets låg, og angiv supernatantens volumen på etiketten. Afkøl derefter straks mikrorørene på isstativet.
- Sæt en ny spids på mikropipetten for hver supernatant. Hvis en stor mængde fedtstoffer sætter sig fast i spidsen, skal den straks udskiftes, for at forhindre at leverekstraktet kontamineres med fedtstoffet.
- Fordel hele den centrifugerede supernatant i fire 0,5 ml-mikrorør i henhold til ovennævnte procedure.
- Når supernatanten er fordelt i mikrorørene, anbringes de alle i reagensglasstativet med identifikationsetiketten og nedfryses straks. Hvis VTG-koncentrationerne måles umiddelbart efter forbehandlingen, holdes et af mikrorørene (som indeholder 30 µl supernatant) afkølet i reagensglasstativet og overføres til den arbejdsstation, hvor ELISA-assayet udføres. I givet fald anbringes de resterende mikrorør i reagensglasstativerne og fryses i fryseren.
- Når supernatanten er indsamlet, kasseres remanensen med det samme.

Opbevaring af prøven

Opbevar mikrorørene med supernatanten fra leverhomogenatet ved ≤ -70 °C, indtil de skal bruges til ELISA-assayet.

Fremgangsmåde 3A: Zebrafisk, indsamling af blod fra halevenen/-arterien

Umiddelbart efter bedøvelse afskæres haleroden på tværs, og blod indsamles fra halevenen/-arterien med et hepariniseret mikrohæmatokrit-kapillærrør. Blodvolumenerne er 5-15 mikroliter afhængigt af fiskens størrelse. Et tilsvarende volumen aprotininbuffer (6 mikrogram/ml i PBS) tilsættes til mikrokapillærrøret, og plasma separeres fra blodet ved centrifugering (fem minutter ved 600 g). Plasma indsamles i testrørene og opbevares ved -20 °C, indtil de skal analyseres for VTG eller andre proteiner af interesse.

Fremgangsmåde 3B: Zebrafisk, indsamling af blod ved hjertepunktur

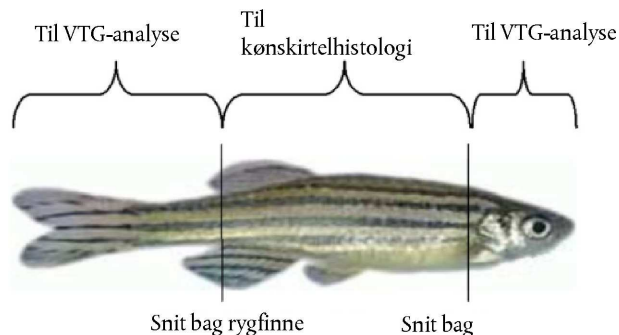
For at undgå koagulering af blod og nedbrydning af protein indsamles prøverne i phosphatbufret saltvand (PBS), som indeholder heparin (1 000 enheder/ml) og proteaseinhibitoren aprotinin (2 TIU/ml). Det anbefales at bruge heparin, ammonium-salt og lyofiliseret aprotinin som bestanddele i bufferen. Det anbefales at bruge en kanylen (1 ml) med en fast tynd nål (f.eks. Braun Omnikan-F) til blodprøveudtagning. Kanylen bør på forhånd være påfyldt buffer (ca. 100 mikroliter) for helt at eluere de små volumener blod fra hver fisk. Blodprøverne udtages ved hjertepunktur. Først bedøves fisken med MS-222 (100 mg/l). Ved det rette anæstesi-niveau kan brugeren identificere zebrafiskens hjerteslag. Under hjertepunktur holdes kanylens stempel under svagt tryk. Der kan indsamles 20-40 mikroliter blod. Efter hjertepunktur fyldes blod/bufferblandingen i reagensglasset. Plasma separeres fra blodet ved centrifugering (20 min.; 5 000 g) og opbevares ved -80 °C, indtil det skal analyseres.

Fremgangsmåde 3C: Standardprocedure: Zebrafisk, homogenisering af hoved og hale

1. Fiskene bedøves og aflives i overensstemmelse med testbeskrivelsen.
2. Hoved og hale skæres af fisken i overensstemmelse med figur 1.

Bemærk: Alle dissektionsinstrumenter og skærebrættet skylles og rengøres grundigt (f.eks. med 96 % ethanol) mellem håndtering af hver enkelt fisk for at forebygge »vitellogeninforurening« fra hunner eller inducerede hanner til ikke-inducerede hanner.

Figur 1



3. Den samlede vægt af hoved og hale fra hver fisk måles til nærmeste mg.
4. Når delene er vejjet, anbringes de i passende rør (f.eks. 1,5 ml eppendorf) og nedfryses ved -80°C indtil homogenisering eller homogeniseres direkte på is med to plastpistiller. (Der kan bruges andre metoder, hvis de anvendes på is og resulterer i en homogen masse). Bemærk: Rørene nummereres korrekt, så fiskens hoved og hale kan knyttes til deres respektive kropssektion, der benyttes til histologisk undersøgelse af kønskirtlerne.
5. Når der er opnået en homogen masse, tilsættes en mængde iskold **homogeniseringsbuffer** (*) på 4 gange vævsvægten. Arbejd til stadighed med pistillerne, indtil blandingen er homogen. Vigtigt: Der bruges nye pistiller til hver fisk.
6. Prøverne lægges på is indtil centrifugering ved 4°C ved 50 000 g i 30 min.
7. Anvend en pipette til at fordele portioner a 20 μl supernatant i **mindst to** rør ved at dyppe spidsen af pipetten ned under fedtlaget på overfladen og omhyggeligt suge supernatanten op uden dele af hverken fedt eller pellets.
8. Rørene opbevares ved -80°C indtil brug.

(*) Homogeniseringsbuffer:

— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % proteaseinhibitorblanding (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 μl proteaseinhibitorblanding.
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), f.eks. fra Bie & Berntsen, Danmark.
— Proteaseinhibitorblanding: Fra Sigma (til pattedyrvæv), produktnummer P 8340.

BEMÆRK: Homogeniseringsbufferen skal anvendes samme dag, som den er fremstillet. Anbringes på is under brug.

Tillæg 7

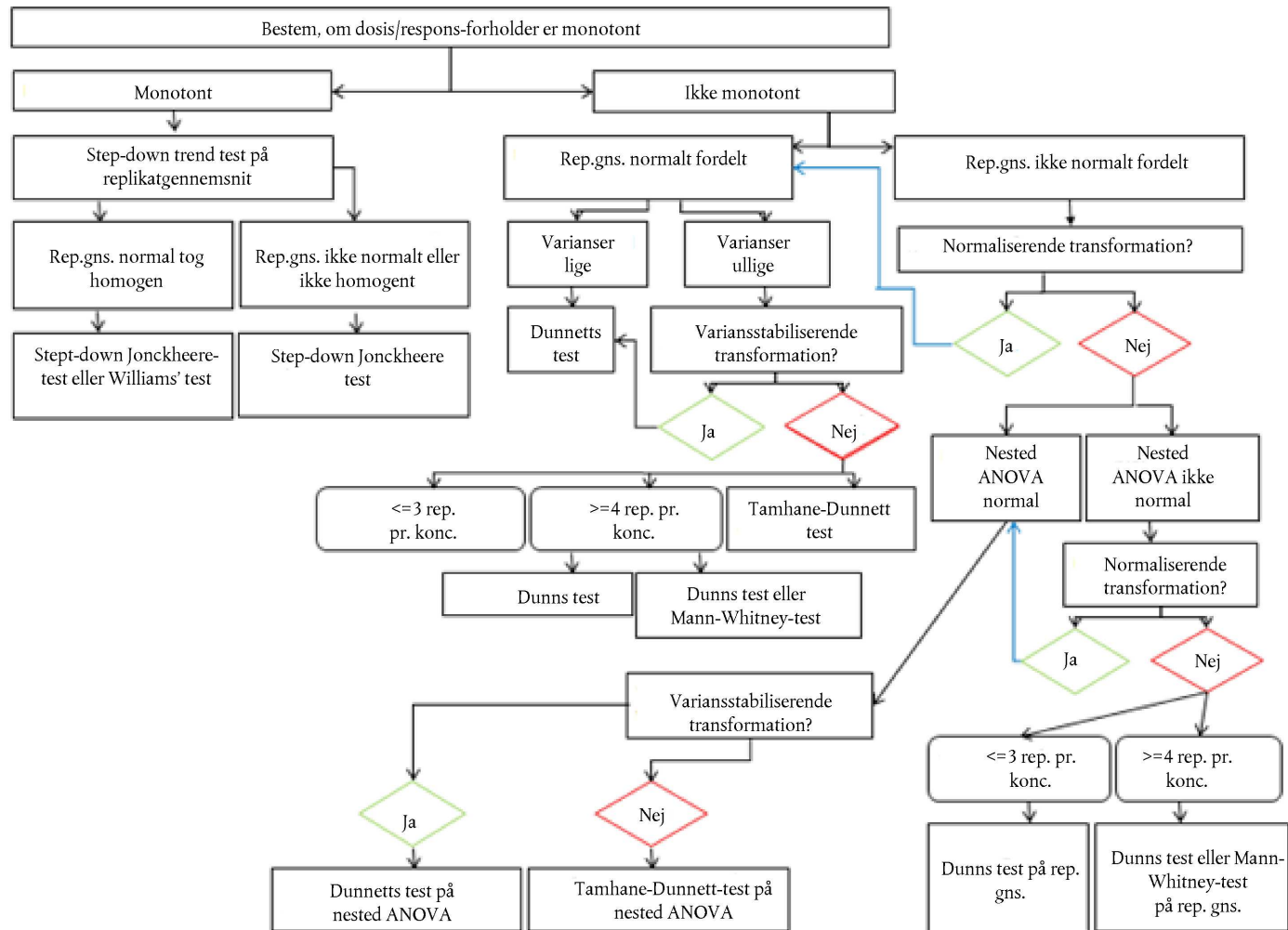
VITELLOGENINSPIKEDE PRØVER OG REFERENCESTANDARD FOR ASSAYET

På hver dag, hvor der gennemføres VTG-assay, analyseres en spiket prøve, der fremstilles med en referencestandard for assayet. Det VTG, der bruges til at fremstille referencestandarden for assayet, vil være fra et andet parti end det, der bruges til at fremstille kalibreringsstandarder for det udførte assay.

Den spikede prøve fremstilles ved at tilsætte en kendt mængde af standarden for assayet til en prøve af plasma fra hanner i kontrollerne. Prøven spikes til en VTG-koncentration på 10-100 gange den forventede vitellogeninkoncentration for hanner i kontrollerne. Den spikede prøve af plasma fra hanner i kontrollerne kan være fra en enkelt fisk eller en kombination af flere fisk.

En underprøve af ikke-spiket plasma fra hanner i kontrollerne analyseres i mindst to duplikate brønde. Den spikede prøve analyseres også i mindst to duplikate brønde. Den gennemsnitlige mængde vitellogenin i de to ikke-spikede prøver af plasma fra hanner i kontrollerne lægges til den beregnede mængde VTG, der tilsættes til prøverne for at bestemme en forventet koncentration. Forholdet mellem denne forventede koncentration og den målte koncentration registreres i rapporten sammen med resultaterne af hvert sæt assay gennemført på den pågældende dag.

BESLUTNINGSFLOWDIAGRAM TIL STATISTISK ANALYSE



C.49 Test af akut toksicitet for fiskeembryoner (FET)

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline) (TG) 236 (2013). Den beskriver en test af akut toksicitet for fiskeembryoner (FET) hos zebrafisk (*Danio rerio*). Formålet med denne test er at bestemme kemikaliers akutte toksicitet for fisk i fosterstadiet. FET-testen er baseret på undersøgelser og valideringsaktiviteter udført på zebrafisk (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14). FET-testen har med stor succes været anvendt på en lang række kemikalier, der udviser forskellige virkemåder, opløseligheder, volatilitet og hydrofobiciteter (revideret i 15 og 16).
2. Definitioner anvendt i denne forsøgsmetode er anført i tillæg 1.

PRINCIP FOR TESTEN

3. Nybefrugtede zebrafiskeæg eksponeres for testkemikallet i en periode på 96 timer. Hver 24. time registreres op til fire apikale observationer som indikatorer for dødelighed (6): i) koagulering af befrugtede æg, ii) mangel på dannelse af somitter, iii) manglende løsningen af halen fra blommesækken og iv) manglende hjerteslag. Efter eksponeringsperioden bestemmes akut toksicitet på grundlag af et positivt resultat i en hvilken som helst af de fire registrerede apikale observationer, og LC₅₀ beregnes.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

4. Nyttige oplysninger om stofspecifikke egenskaber omfatter strukturformlen, molekylvægt, renhed, vand- og lysstabilitet, pK_a and K_{ow}, vandopløselighed og damptryk samt resultaterne af en test for bionedbrydelighed (TM C.4 (17) eller TM C.29 (18)). Opløseligheden og damptrykket kan bruges til at beregne Henrys konstant, som angiver, om der kan forekomme et tab som følge af fordampning af testkemikallet. En pålidelig analyse til kvantificering af kemikallet i testopløsningerne med kendt og publiceret "accuracy" og nederste målegrænse bør foreligge.
5. Hvis forsøgsmetoden anvendes til at teste en blanding, bør der så vidt muligt foreligge oplysninger om dens sammensætning, f.eks. i form af bestanddelenes kemiske identitet, deres kvantitative forekomst og deres stofspecifikke egenskaber (jf. punkt 4). Før brug af forsøgsmetoden til lovmæssig test af en blanding bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til det lovgivningsmæssige anvendelsesformål.
6. For stoffer, der kan aktiveres via metabolisme, er der dokumentation for, at zebrafisks embryoner har biotransformationskapacitet (19) (20) (21) (22). Den metaboliske kapacitet hos fisk i fosterstadiet er imidlertid ikke altid den samme som hos unge eller voksne fisk. Eksempelvis blev protoxicanten allylalkohol ikke påvist som giftig (9) i FET. Hvis der derfor er tegn på, at metabolitter eller andre relevante omdannelsesprodukter kan være mere toksiske end moderforbindelsen, anbefales det også at udføre testen med disse metabolitter/ omdannelsesprodukter og anvende disse resultater ved fastlæggelsen af testkemikallets toksicitet eller alternativt foretage en ny test, som tager yderligere højde for metabolisme.
7. For stoffer med en molekylvægt på ≥ 3 kDa, en meget omfangsrig molekylestruktur og stoffer, der forårsager forsinket klækning, som kan forhindre eller reducere eksponeringen efter klækning, ventes embryoner ikke at være følsomme på grund af stoffets begrænsede biotilgængelighed, og andre toksicitetstest kan være mere hensigtsmæssige.

TESTENS GYLDIGHED

8. Testresultaternes validitet forudsætter følgende:
 - a) Den samlede befrugtning af alle indsamlede æg bør være ≥ 70 % i det undersøgte parti.

- b) Vandtemperaturen bør holdes på $26\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ i testbeholdere på ethvert tidspunkt under testen.
- c) Den samlede overlevelse af embryoner i den negative kontrol (fortyndingsvand) og, hvor det er relevant, i opløsningsmiddelkontrollen bør være $\geq 90\%$ indtil slutningen af de 96 timers eksponering.
- d) Eksponering for den positive kontrol (f.eks. $4,0\text{ mg/l}$ 3,4-dichloranilin for zebrafisk) bør resultere i en minimumsdødelighed på 30% efter 96 timers eksponering.
- e) Klækningshastigheden i den negative kontrol (og evt. opløsningsmiddelkontrollen) bør være $\geq 80\%$ efter 96 timers eksponering.
- f) Efter 96 timers eksponering bør koncentrationen af opløst ilt i den negative kontrol og den højeste testkoncentration være $\geq 80\%$ mætning.

BESKRIVELSE AF METODEN

9. En oversigt over anbefalede vedligeholdelses- og testbetingelser findes i tillæg 2.

Apparatur

10. Der er behov for følgende udstyr:

- a) fisketanke fremstillet af et kemisk inert materiale (f.eks. glas) og med passende kapacitet i forhold til den anbefalede belastningsgrad (jf. "Vedligeholdelse af yngelfisk", punkt 14)
- b) inverteret mikroskop og/eller kikkert med en forstørrelseskapacitet på mindst 80 fold. Hvis det lokale, der benyttes til registrering af observationer, ikke kan indstilles til $26 \pm 1\text{ °C}$, er der behov for et temperaturstyret flytbart bord eller andre metoder til at opretholde temperaturen.
- c) testkamre, f.eks. plader med 24 brønde af standardtypen med en dybde på ca. 20 mm (jf. "Testkamre", punkt 11)
- d) f.eks. selvklæbende folie til dækning af pladerne med 24 brønde
- e) inkubator eller luftkonditionerede rum med temperaturstyring, der gør det muligt at opretholde $26 \pm 1\text{ °C}$ i brønde (eller testkamre)
- f) pH-meter
- g) oxygenmeter
- h) udstyr til bestemmelse af vandets hårdhed og ledningsevne
- i) gydefælde: instrumentbakker af glas, rustfrit stål eller andet inert materiale, trådnat (gitterstørrelse $2 \pm 0,5\text{ mm}$) af rustfrit stål eller andet inert materiale til at beskytte æggene, når de er lagt; gydningssubstrat (f.eks. planteafterligninger af inert materiale) (TM C. 48, tillæg 4a (23))
- j) pipetter med brede åbninger til at indsamle æg
- k) glaskar til at klargøre forskellige testkoncentrationer og fortyndingsvand (bægerglas, målekolber, målecylindere og målepipetter) eller til at indsamle zebrafiskeæg (f.eks. bægerglas, krystallisationsskåle)
- l) Hvis der anvendes alternative eksponeringssystemer, som f.eks. gennemstrømning (24) eller passiv dosering (25), til udførelsen af testen, er der behov for passende faciliteter og udstyr.

Testkamre

11. Der bør anvendes testkamre af glas eller polystyren (f.eks. plader med 24 brønde med 2,5-5 ml påfyldningskapacitet pr. brønd). Ved mistanke om adsorption til polystyren (f.eks. for ikke-polære, plane stoffer med høj K_{ow}) bør der anvendes inert materiale (glas) til at begrænse tabene på grund af adsorption (26). Testkamrene bør placeres randomiseret i inkubatoren.

Vand- og testbetingelser

12. Det anbefales også at fortynde vedligeholdelsesvandet for at opnå de typiske hårdhedsniveauer for en bred vifte af overfladevand. Vand til fortynding bør fremstilles på baggrund af kunstigt fremstillet ferskvand (27). Den dannede hårdhed bør svare til 100-300 mg/l CaCO_3 for at undgå for stor udfældning af calciumcarbonat. Andet velkarakteriseret overflade- eller brøndvand kan anvendes. Kunstigt fremstillet ferskvand kan tilpasses vedligeholdelsesvand med lav hårdhed ved fortynding med deioniseret vand op til et forhold på 1:5 og en hårdhed på mindst 30-35 mg/l CaCO_3 . Vandet beluftes til iltmætning før tilsætning af testkemikaliet. Temperaturen bør holdes på $26 \pm 1^\circ\text{C}$ i brøndene under hele testen. PH-værdien bør være mellem 6,5 og 8,5 og må ikke variere inden for dette område med mere end 1,5 enheder i løbet af testen. Hvis pH-værdien ikke forventes at holde sig inden for dette interval, bør den tilpasses inden testen. PH-justeringen bør foretages på en sådan måde, at stamopløsningens koncentration ikke ændres nævneværdigt, og så der ikke sker nogen kemisk reaktion eller udfældning af testkemikaliet. Det anbefales at bruge hydrogencchlorid (HCl) og natriumhydroxid (NaOH) til justering af pH i opløsninger, der indeholder testkemikaliet.

Testopløsninger

13. Testopløsninger med den valgte koncentration kan f.eks. fremstilles ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsninger bør fortrinsvis fremstilles ved mekanisk opblanding eller omrystning af testkemikaliet i fortyndingsvandet (f.eks. ved omrøring eller ultralydbehandling). Hvis testkemikaliet er vanskeligt at opløse i vand, bør de procedurer, der er beskrevet i OECD's vejledning nr. 23 om håndtering af vanskelige stoffer og blandinger følges (28). Anvendelse af opløsningsmidler bør undgås, men kan i nogle tilfælde være nødvendig for at fremstille en stamopløsning med en passende koncentration. Når der anvendes et opløsningsmiddel som hjælpemiddel ved fremstillingen af stamopløsninger, bør dens slutkoncentration ikke være højere end 100 µl/l og bør være den samme i alle testbeholdere. Når der anvendes et opløsningsmiddel, er der behov for yderligere opløsningsmiddelkontrol.

Vedligeholdelse af yngelfisk

14. En avlsdyrbestand bestående af ueksponerede, vilde zebrafisk med veldokumenteret befrugtning af æg anvendes til produktion af æg. Fiskene bør være fri for makroskopisk synlige symptomer på infektion og sygdomme og bør ikke have undergået nogen form for farmaceutisk (akut eller profylaktisk) behandling i to måneder før gydning. Avlsfisk holdes i akvarier med et anbefalet rumindhold på 1 liter vand pr. fisk og en fast lysperiode på 12-16 timer (29) (30) (31) (32) (33). Optimal filtrering bør tilpasses, og overskydende filtrering, der medfører kraftige forstyrrelse af vandet, bør undgås. Vedrørende fodring, se tillæg 2. Overskuds fodring bør undgås, og vandets kvalitet og akvariets renhed bør overvåges regelmæssigt og om nødvendigt nulstilles til den oprindelige tilstand.

Præstationstest

15. Som referencekemikalie bør 3,4-dichloranilin (som anvendes i valideringsundersøgelser (1) (2)) testes i en fuld koncentration/respons til kontrol af følsomheden af den anvendte fiskestamme, fortrinsvis to gange om året. Ethvert laboratorium bør, når det påbegynder brug af dette assay, benytte referencekemikaliet. Et laboratorium kan benytte disse kemikalier til at godtgøre sin tekniske kompetence vedrørende udførelsen af assayet, inden det påbegynder fremsendelse af data til forskriftsmæssige formål.

Ægproduktion

16. Zebrafiskeæg kan produceres i gydegrupper (i individuelle gydetanke) eller via massegydning (i vedligeholdelsestankene). Med hensyn til gydegrupper placeres hanner og hunner (f.eks. i forholdet 2:1) i en avlsgruppe i gydetanke et par timer før mørkets frembrud på dagen før testen. Da gydegrupper af zebrafisk undertiden ikke gyder, anbefales det parallelt dermed at anvende mindst tre gydetanke. For at undgå genetiske skævheder indsamles der æg fra mindst tre blandede og tilfældigt udvalgte avlsgrupper.
17. Til indsamling af æg anbringes gydefælder i gydetankene eller vedligeholdelsestankene inden mørkets frembrud på dagen før testen eller før lysets frembrud på selve testdagen. For at forhindre voksne zebrafisks rov af æg er gydefælderne dækket af inert trådnat af passende maskestørrelse (ca. $2 \pm 0,5$ mm). Hvis det anses for nødvendigt, kan kunstige planter fremstillet af et inert materiale (f.eks., plast eller glas) fastgøres til nettet som gydestimulus (3) (4) (5) (23) (35). Der bør anvendes forvitret plastmateriale som ikke lækker (f.eks. phthalater). Parring, gydning og befrugtning sker inden for 30 min. efter lysets frembrud, og gydefælderne med de indsamlede æg kan forsigtigt fjernes. Det anbefales at skylle æggene med kunstigt fremstillet ferskvand efter indsamling fra gydefælderne.

Differentiering af æg

18. Ved 26 °C deler befrugtede æg sig første gang efter ca. 15 min., og de efterfølgende synkrone delinger danner 4, 8, 16 og 32 celleblastomerer (jf. tillæg 3) (35). I disse faser kan de befrugtede æg let identificeres med udviklingen af et blastula.

FREMGANGSMÅDE

Eksponeringsbetingelser

19. Tyve embryoner pr. koncentration (et embryo pr. brønd) eksponeres for testkemikaliets. Eksposeringen bør foregå på en sådan måde, at der fastholdes ± 20 % af den nominelle kemikaliekoncentration under hele testen. Hvis dette ikke er muligt i et statisk system, bør der anvendes et overskueligt semistatisk udskiftningsinterval (f.eks. udskiftning hver 24. time). I disse tilfælde skal eksponeringskoncentrationerne verificeres som minimum i den højeste og den laveste testkoncentration ved begyndelsen og slutningen af hvert eksponeringsinterval (jf. punkt 36). Hvis der ikke kan opretholdes en eksponeringskoncentration på ± 20 % af de nominelle koncentrationer, skal alle koncentrationer måles ved begyndelsen og slutningen af hvert eksponeringsinterval (jf. punkt 36). Ved udskiftning bør det påses, at embryoner fortsat er dækket af en lille mængde af den gamle testopløsning, så de ikke tørrer ud. Testdesignet kan tilpasses, så det opfylder testkravene til specifikke stoffer (f.eks. gennemstrømning (24) eller passive doseringssystemer (25) i forbindelse med let nedbrydelige eller meget adsorptive stoffer (29) eller andre for flygtige stoffer (36) (37)). Under alle omstændigheder bør der drages omsorg for at minimere stress for embryonerne. Testkamrene bør konditioneres i mindst 24 timer med testopløsningerne, inden testen påbegyndes. Testbetingelserne er opsummeret i tillæg 2.

Testkoncentrationer

20. Normalt kræves fem koncentrationer af testkemikaliets med en konstant afstandsfaktor, som ikke overstiger 2,2, for at opfylde de statistiske krav. Det bør begrundes, såfremt der anvendes færre end fem koncentrationer. Den højeste testede koncentration bør helst medføre 100 % dødelighed, mens den laveste koncentration helst ikke må medføre nogen observerbar effekt som defineret i punkt 28. En fortest inden den endelige test gør det muligt at vælge et passende koncentrationsinterval. Fortesten udføres typisk med 10 embryoner pr. koncentration. Følgende instruktioner henviser til udførelse af testen i plader med 24 brønde. Hvis der anvendes andre testkamre (f.eks. små petriskåle), eller hvis der testes flere koncentrationer, skal instruktionerne justeres i overensstemmelse hermed.

21. Nærmere oplysninger og visuelle instruktioner vedrørende allokering af koncentrationer i plader med 24 brønde findes i punkt 27 og tillæg 4, figur 1.

Kontroller

22. Det er nødvendigt at foretage kontrol af fortyndingsvand, både som negativ kontrol og som intern pladekontrol. Hvis der observeres mere end et dødt embryo i den interne pladekontrol, afvises pladen, og dermed reduceres antallet af koncentrationer, der bruges til at udlede LC_{50} . Hvis en hel plade afvises, kan det blive vanskeligt at vurdere og udlede observerede virkninger, især hvis den afviste plade er pladen til opløsningsmiddelkontrol eller en plade, hvori de behandlede embryoner også påvirkes. I det første tilfælde skal testen gentages. I det andet tilfælde kan tabet af en hel behandlingsgruppe på grund af dødelighed i den interne kontrol begrænse evnen til at vurdere virkningerne og bestemme LC_{50} -værdier.
23. Der udføres en positiv kontrol i en fast koncentration på 4 mg/l 3,4-dichloranilin med hvert parti æg, der anvendes til testen.
24. Hvis der anvendes opløsningsmiddel, eksponeres endnu en gruppe på 20 embryoner for opløsningsmidlet på en separat plade med 24 brønde, som dermed fungerer som opløsningsmiddelkontrol. For at anse testen for at være acceptabel bør det påvises, at opløsningsmidlet ikke har nogen signifikant virkning på klækningstid og overlevelse og ikke har andre skadelige virkninger på embryonerne (jf. punkt 8c).

Påbegyndelse af eksponering og testens varighed

25. Testen påbegyndes så hurtigt som muligt efter befrugtningen af æggene og afsluttes efter 96 timers eksponering. Embryonerne bør nedsænkes i testopløsningerne, inden blastocysten begynder at dele sig eller senest inden fasen med 16 celler. For at påbegynde eksponeringen med den mindst mulige forsinkelse udvælges mindst dobbelt så mange æg, som der er behov for, for hver behandlingsgruppe, og overføres til de respektive koncentrationer og kontroller (f.eks. i krystallisationsskåle på 100 ml; æggene bør være helt dækket) senest 90 minutter efter befrugtningen.
26. Levedygtige befrugtede æg bør adskilles fra ubefrugtede æg og overføres til plader med 24 brønde forkonditioneret i 24 timer og genopfyldes med 2 ml/brønd frisk fremstillede testopløsninger inden for 180 minutter efter befrugtning. Ved hjælp af stereomikroskopi (helst ≥ 30 -fold forstørrelse) udvælges befrugtede æg, som er ved at dele sig og ikke udviser synlige uregelmæssigheder under delingen (f.eks. asymmetri, vesikeldannelse) eller skader på chorion. Vedrørende indsamling af æg og adskillelse, se tillæg 3, fig. 1 og 3, og tillæg 4, fig. 2.

Fordeling af æg i plader med 24 brønde

27. Æggene fordeles i brøndplader som følger (jf. også bilag 4, fig. 1)
- 20 æg på en plade for hver testkoncentration.
 - 20 æg som opløsningsmiddelkontrol på en plade (om nødvendigt)
 - 20 æg som positiv kontrol på en plade
 - 4 æg i fortyndingsvand som intern pladekontrol på hver af ovennævnte plader
 - 24 æg i fortyndingsvand som negativ kontrol på en plade.

Observationer

28. Apikale observationer foretaget på hvert testet embryon omfatter: koagulering af embryoner, manglende dannelse af somitter, manglende løsningen af halen og manglende hjerteslag (tabel 1). Disse observationer anvendes til at bestemme dødeligheden: Et positivt resultat i en af disse observationer betyder, at zebrafiskembryonet er dødt. Desuden registreres klækning i behandlings- og kontrolgrupper dagligt fra 48 timer. Observationer registreres hver 24. time indtil testens slutning.

Tabel 1

Apikale observationer af akut toksicitet i zebrafiskembryoner 24-96 timer efter befrugtning

	Eksponeringsstid			
	24 timer	48 timer	72 timer	96 timer
Koagulerede embryoner	+	+	+	+
Manglende dannelse af somitter	+	+	+	+
Manglende løsningen af halen	+	+	+	+
Manglende hjerteslag		+	+	+

29. *Koagulering af embryonet*: Koagulerede embryoner er mælkehvide og ser mørke ud under mikroskop (jf. tillæg 5, fig. 1). Antallet af koagulerede embryoner bestemmes efter 24, 48, 72 og 96 timer.
30. *Manglende dannelse af somitter*: Ved 26 ± 1 °C er der efter 24 timer dannet ca. 20 somitter (jf. tillæg 5, figur 2) i et normalt udviklet zebrafiskembryon. Et normalt udviklet embryon viser spontane bevægelser (kontraktioner fra side til side). Spontane bevægelser viser dannelse af somitter. Manglende somitter registreres efter 24, 48, 72 og 96 timer. Manglende dannelse af somitter efter 24 timer kan skyldes en generel forsinkelse i udviklingen. Senest efter 48 timer bør dannelsen af somitter være udviklet. Hvis ikke betragtes embryonerne som døde.
31. *Manglende løsningen af halen*: På et normalt udviklet zebrafiskeembryon observeres løsningen af halen (jf. tillæg 5, figur 3) fra blommen efter forlængelse bagud af embryonets legeme. Manglende løsningen af halen registreres efter 24, 48, 72 og 96 timer.
32. *Manglende hjerteslag*: Ved 26 ± 1 °C er der i et normalt udviklet zebrafiskeembryon et synligt hjerteslag efter 48 timer (jf. tillæg 5, figur 4). Der bør udvises særlig omhu ved registrering af dette endepunkt, da uregelmæssige (ujævne) hjerteslag ikke skal registreres som dødelige. Endvidere anses et synligt hjerteslag uden omløb i aorta abdominalis som ikke-dødeligt. For at registrere dette endepunkt bør embryoner, der ikke viser noget hjerteslag, observeres i en forstørrelse på mindst 80x i mindst et minut. Manglende hjerteslag registreres efter 48, 72 og 96 timer.
33. Klækning af alle behandlings- og kontrolgrupper bør registreres fra 48 timer og herefter og rapporteres. Selv om klækning ikke er et endepunkt, som anvendes til beregning af LC_{50} , sikrer klækning, at embryonet eksponeres uden chorions potentielle barrierefunktion, og dette kan være en hjælp til fortolkning af data.
34. Detaljerede beskrivelser af normalen (35) og eksempler på unormal udvikling af zebrafiskeembryoner er vist i tillæg 3 og 5.

Analysesemålinger

35. Ved begyndelsen og afslutningen af testen måles pH, hårdhedsgrad og ledningsevne i kontrolgruppen/-erne og i den højeste koncentration af testkemikaliet. I semistatiske udskiftningssystemer bør pH måles før og efter vandudskiftning. Koncentrationen af opløst ilt måles ved testens afslutning i de negative kontroller og den højeste testkoncentration for levedygtige embryoner, som bør opfylde validitetskriterierne for testen (jf. punkt 8f). Hvis der er bekymring for, at temperaturen varierer for pladerne med 24 brønde, måles temperaturen i tre tilfældigt udvalgte beholdere. Temperaturen bør helst registreres kontinuerligt under testen eller som minimum dagligt.
36. Koncentrationen af testkemikaliet bør som minimum måles ved den højeste og laveste testkoncentration, men helst i alle behandlinger, ved testens begyndelse og slutning. Ved semistatiske test (udskiftningstest), hvor testkemikaliet koncentration forventes at holde sig inden for $\pm 20\%$ af de nominelle værdier, anbefales det som et minimum, at den højeste og den laveste testkoncentration analyseres, når de lige er fremstillet og umiddelbart inden udskiftning. I forbindelse med test, hvor testkemikaliet ikke forventes at holde sig inden for $\pm 20\%$ af den nominelle koncentration, skal alle testkoncentrationer analyseres, når de er frisk fremstillede og umiddelbart inden udskiftning. I tilfælde af en utilstrækkelig analysevolumen kan det være nyttigt at sammenlægge testopløsninger eller anvende surrogatkamre af samme materiale og med samme forhold mellem rumfang og overfladeareal som plader med 24 brønde. Det anbefales stærkt, at resultaterne baseres på målte koncentrationer. Når koncentrationerne ikke holder sig inden for 80-120 % af den nominelle koncentration, bør effektkoncentrationerne udtrykkes i forhold til den geometriske middelværdi af de målte koncentrationer, se kapitel 5 i OECD's vejledning: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (28).

GRÆNSETEST

37. Med den i denne metode beskrevne fremgangsmåde kan der udføres en grænsetest ved 100 mg/l testkemikalie, dog ikke højere end kemikaliet opløselighed i testmediet, med henblik på at godtgøre, at LC_{50} er større end denne koncentration. Grænsetesten bør udføres med 20 embryoner i behandlingen, den positive kontrol og — om nødvendigt — opløsningsmiddelkontrollen og 24 embryoner i den negative kontrol. Hvis den procentvise dødelighed ved den testede koncentration overstiger dødeligheden i den negative kontrol (eller opløsningsmiddelkontrollen) med 10 %, bør der udføres en komplet test. Observerede virkninger bør registreres. Hvis dødeligheden overstiger 10 % i den negative kontrol (eller opløsningsmiddelkontrollen), bliver testen ugyldig og bør gentages.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

38. I denne test betragtes de enkelte brønde som uafhængige paralleller til statistisk analyse. Der optegnes en kurve over procentdel embryoner, hvor mindst en af de apikale observationer er positiv ved 48 og/eller 96 timer, i forhold til testkoncentrationer. Til beregning af kurvens hældning, LC_{50} værdier og konfidensgrænser (95 %) bør der anvendes passende statistiske metoder (38), og OECD's vejledning: Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data bør konsulteres (39).

Testrapport

39. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

Stof med kun en bestanddel

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

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

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

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

Testorganismer:

- videnskabeligt navn, stamme, kilde og metode til indsamling af befrugtede æg og behandlingen af dem.

Testbetingelser:

- testprocedure (f.eks. semistatisk udskiftning)
- lysperiode
- testdesign (f.eks. antal testkamre, typer kontrol)
- kvalitetskarakteristika for vandet ved hold af fisk (f.eks. pH, hårdhedsgrad, temperatur, ledningsevne og opløst ilt)
- koncentration af opløst ilt, pH, samlet hårdhedsgrad, temperatur og ledningsevne for testopløsningerne i starten og efter 96 timer
- metode til fremstilling af stamopløsninger og testopløsninger samt hyppighed af udskiftninger
- begrundelse for brug af bærestof og begrundelse for valg af opløsningsmiddel, hvis dette ikke er vand
- de nominelle testkoncentrationer og resultatet af alle analyser til bestemmelse af koncentrationen af testkemikaliet i testbeholderne; metodens genfindingsgrad og kvantificeringsgrænsen (LoQ) bør også rapporteres
- bevis på, at kontrollerne opfyldte de generelle validitetskriterier for overlevelse
- æggenes befrugtningshastighed
- klækningshastighed i behandlings- og kontrolgrupper

Resultater:

- højeste koncentration, der ikke forårsager dødelighed inden for testperioden
- mindste koncentration, der forårsager 100 % dødelighed inden for testperioden
- kumulativ dødelighed for hver koncentration på de anbefalede observationstidspunkter
- LC₅₀-værdier efter 96 timer (og eventuelt efter 48 timer) for dødelighed med 95 %-konfidensgrænser, hvis det er muligt
- afbildning af koncentration/dødelighedskurve ved testens afslutning
- dødelighed i kontrollerne (negative kontroller, interne pladekontroller samt positiv kontrol og anvendte opløsningsmiddelkontroller)
- oplysninger om resultatet af hver af de fire apikale observationer
- forekomst og beskrivelse af eventuelle morfologiske og fysiologiske abnormiteter (jf. eksemplerne i tillæg 5, figur 2)
- hændelser i løbet af testen, der kan have påvirket resultaterne

- statistisk analyse og behandling af data (probabilistiske analyser, model for logistisk regression og geometrisk middelværdi for LC_{50})
- hældning og konfidensgrænser for regression af den (transformerede) koncentration/respons-kurve.

Afviselser fra forsøgsmetoden og relevante forklaringer.

Diskussion og fortolkning af resultater.

LITTERATUR

- 1) OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, OECD, Paris.
- 2) OECD (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179, OECD, Paris.
- 3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. and Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute fish LC_{50} test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: 87-102.
- 4) ISO (2007) International Standard Water quality — Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) International Organization for Standardization.
- 5) Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) — a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38-48.
- 6) Schulte, C. and Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test — preliminary results. ATLA 22, 12-19.
- 7) Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). PhD-thesis, Technical University of Dresden, Germany.
- 8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. and Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: 2087-2102.
- 9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 9690-9700.
- 10) Kammann, U., Vobach, M. and Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 97-102.
- 11) Groth, G., Kronauer, K. and Freundt, K.J. (1994) Effects of N,N-dimethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. In Vitro 8: 401-406.
- 12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. and Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with N-methylamine, N,N-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, N-methylaniline, N,N-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: 878-882.
- 13) Nguyen, L.T. and Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: 566-571.
- 14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. og Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: 3024-3031.
- 15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. and Carr G. J. (2013). Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry, 32: 1768-1783.

- 16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*: 149 (2), 196-209.
- 17) Chapter C.4 of this Annex: Ready Biodegradability.
- 18) Chapter C.29 of this Annex: Ready Biodegradability, CO₂ in sealed vessels.
- 19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology* 281: 25-36.
- 20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Reprod. Toxicol.* 33: 133-141.
- 21) Incardona, J.P., Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 257: 242-249.
- 22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 253: 244-252.
- 23) Kapitel C.48 i dette bilag: Assayet for fisks reproduktion på kort sigt. Se tillæg 4a.
- 24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendler, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. in vitro* 23: 1436-1442.
- 25) Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klamer, H.J.C., (2001) Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4097-4102.
- 26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1676-1682.
- 27) ISO (1996) Internationale standarder. Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Flow-through method. Available: [<http://www.iso.org>].
- 28) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.
- 29) Laale, H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. *J. Fish Biol.* 10: 121-173.
- 30) Westerfield, M. (2007) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5. udgave. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, USA.
- 31) Canadian Council on Animal Care (2005) Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing, ISBN: 0-919087-43-4 <http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf>
- 32) Europa-Kommissionen (2007) Kommissionens henstilling 2007/526/EF af 18. juni 2007 om retningslinjer for anbringelse og pasning af dyr, der anvendes til test og andre videnskabelige formål (meddelt under nummer K (2007) 2525) ([<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:DA:PDF>])
- 33) EU (2010) Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål. Den EUT L 276 af 20.10.2010, s. 33-79.

-
- 34) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrafärblihg (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). J. Appl. Ichthyol. 2: 173-181.
- 35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253-310.
- 36) Kapitel C.2 i dette bilag: Daphnia sp., Akut immobilisationstest.
- 37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect concentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1970-1978.
- 38) ISO (2006) International standard. Water quality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Findes her: [<http://www.iso.org>].
- 39) OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris.
- 40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper "Fish embryo toxicity assays". UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlin. 298 pp.
-

Tillæg 1

DEFINITIONER

Apikalt endepunkt: Forårsager en virkning på populationsniveau.

Blastula: En celledannelse rundt om dyrets poler, som omfatter en bestemt del af blommen.

Kemikalie: Et stof eller en blanding

Epiboli: En massiv spredning af overvejende epidermale celler i embryonets gastrulationsfase og deres bevægelse fra den dorsale til den ventrale side, hvorved entodermale celleglag internaliseres i en invaginationslignende proces, og blommen indføres i embryonet.

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

Intern pladekontrol: Intern kontrol bestående af fire brønde fyldt med fortyndingsvand pr. plade med 24 brønde, som producenten eller forskeren bruger til at identificere potentiel forurening af pladerne under proceduren samt eventuel pladevirkning, som kan påvirke resultatet af testen (f.eks. temperaturgradient).

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Den Internationale Union for Ren og Anvendt Kemi).

Vedligeholdelsesvand: Det vand, som de voksne fisk dyrkes i.

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

Semistatisk udskiftningstest: En test med regelmæssig udskiftning af testopløsningerne efter fastlagte perioder (f. eks. hver 24. time).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Somit: I hvirveldyrembryoner under udvikling er somitter masser af mesoderm fordelt lateralt til neuralrøret, der i sidste ende vil udvikle dermis (dermatom), skeletmuskulatur (myotom) og ryghvirvler (sclerotom).

Statisk test: En test, hvor testopløsningerne ikke ændres i løbet af testen.

Testkemikalie: Et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne forsøgsmetode.

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

Tillæg 2

VEDLIGEHOVELSE, AVL OG TYPISKE BETINGELSER FOR TEST AF AKUT TOKSICITET FOR ZEBRAFISKEMBRYONER

Zebrafisk (<i>Danio rerio</i>)		
Arternes oprindelse		Indien, Burma, Malakka, Sumatra
Kønsdimorfi		Hunner: fremspringende mave, når de bærer æg Hanner: mere slank, orange skær mellem blå langsgående striber (især synlige ved halefinnen)
Fodring		Tørfoder (maks. 3 % af fiskens vægt pr. dag) 3-5 gange dagligt; derudover saltsøkrebs (<i>Artemia spec.</i>) nauplii og/eller små dafnier af passende størrelse fra en ikke-forurenet kilde. Fodring med levende foder er en kilde til miljøberigelse, og der bør derfor så vidt muligt anvendes levende foder. For at sikre optimal vandkvalitet bør overskydende foder og ekskrementer fjernes ca. en time efter fodring.
Voksne fisks omtrentlige vægt		Hunner: 0,65 ± 0,13 g Hanner: 0,5 ± 0,1 g
Vedligeholdelse af forældrefisk	Belysning	Lysstofrør (bredt spektrum); 10-20 µE/m ² /s, 540-1 080 lux eller 50-100 ft-c (laboratorieniveau); 12-16 timers lysperiode
	Vandtemperatur	26 ± 1 °C
	Vandkvalitet	O ₂ ≥ 80 % mætning, hårdhed, f.eks. ~ 30-300 mg/l CaCO ₃ , NO ₃ ⁻ ≤ 48 mg/l, NH ₄ ⁺ og NO ₂ ⁻ < 0,001 mg/l, restchlor < 10 µg/l, total mængde organisk chlor < 25 ng/l, pH = 6,5-8,5
	Yderligere vandkvalitetskriterier	Partikler < 20 mg/l, total mængde organisk kulstof < 2 mg/l, total mængde organiske fosforpesticider < 50 ng/l, total mængde organiske chlorpesticider plus polychlorede biphenyler < 50 ng/l
	Størrelse af vedligeholdelsestank	F.eks. 180 l, 1 fisk/l
	Vandrensning	Fast (kulfiltreret); andre muligheder omfatter kombinationer med halvstatisk udskiftningsvedligeholdelse eller gennemstrømningssystem med kontinuerlig vandudskiftning
	Anbefalede forhold mellem hanner og hunner til avl	2:1 (eller massegydning)
Gydetanke		F.eks. 4-liters tanke forsynet med bund af stålgritter og planteattrap til at stimulere gydning; udvendige varmemåtter eller massegydning i vedligeholdelsestanke
Æggenes struktur og udseende		Stabil chorion (dvs. meget gennemsigtig, ikke-klæbrig, diameter ~ 0,8-1,5 mm)
Gydefrekvens		En enkelt moden hunfisk gyder mindst 50-80 æg pr. dag. Afhængigt af stammen kan gydefrekvensen være betydeligt højere. Befrugtningsfrekvensen bør være ≥ 70 %. For fisk, der skal gyde første gang, kan befrugtningsfrekvensen for æggene være lavere i de første par gydninger.
Testtype		Statisk, semistatisk udskiftning, gennemstrømning, 26 ± 1 °C, 24 timers konditionerede testbeholdere (f.eks. plader med 24 brønde, 2,5-5 ml pr. brønd)

Tillæg 3

NORMAL UDVIKLING HOS ZEBRAFISK VED 26 °C

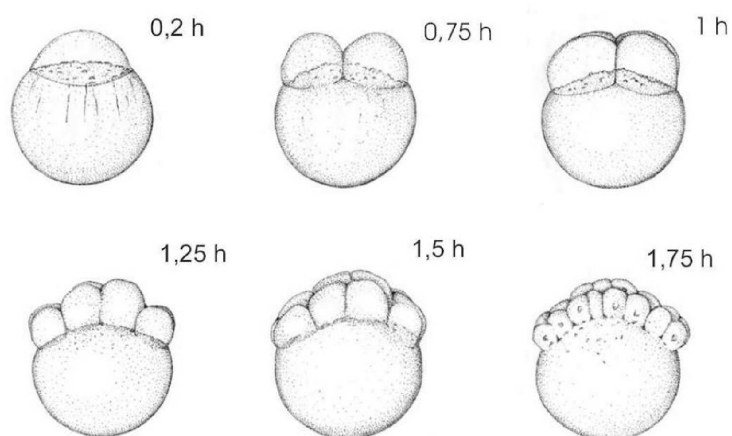


Fig. 1: Udvalgte faser af tidlig udvikling hos zebrafisk (*Danio rerio*): 0,2-1,75 timer efter befrugtningen (fra Kimmel et al., 1995 (35)). Tidssekvensen for normal udvikling kan anvendes til at diagnosticere både befrugtning og æggenes levedygtighed (jf. punkt 26: Udvælgelse af befrugtede æg).

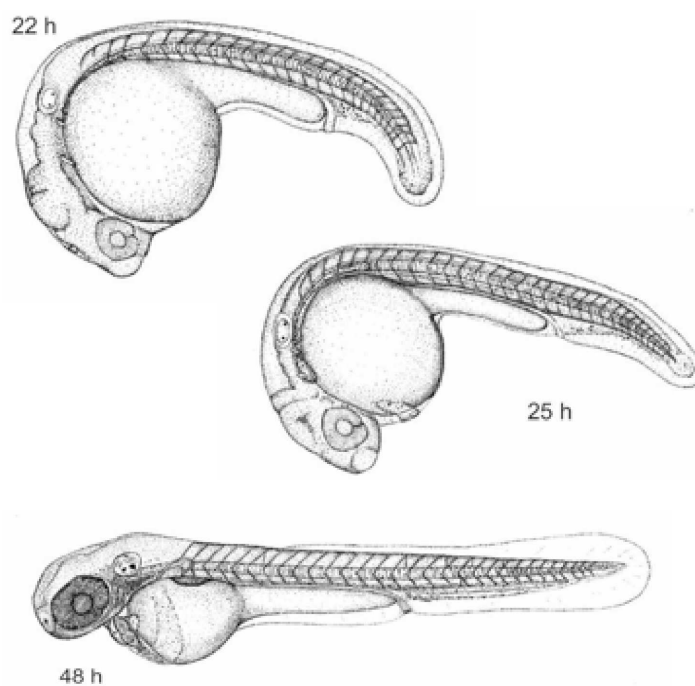


Fig. 2: Udvalgte faser af sen udvikling hos zebrafisk (*Danio rerio*) (embryoner uden chorion for optimal synlighed): 22-48 timer efter befrugtning (fra Kimmel et al., 1995 (35)).

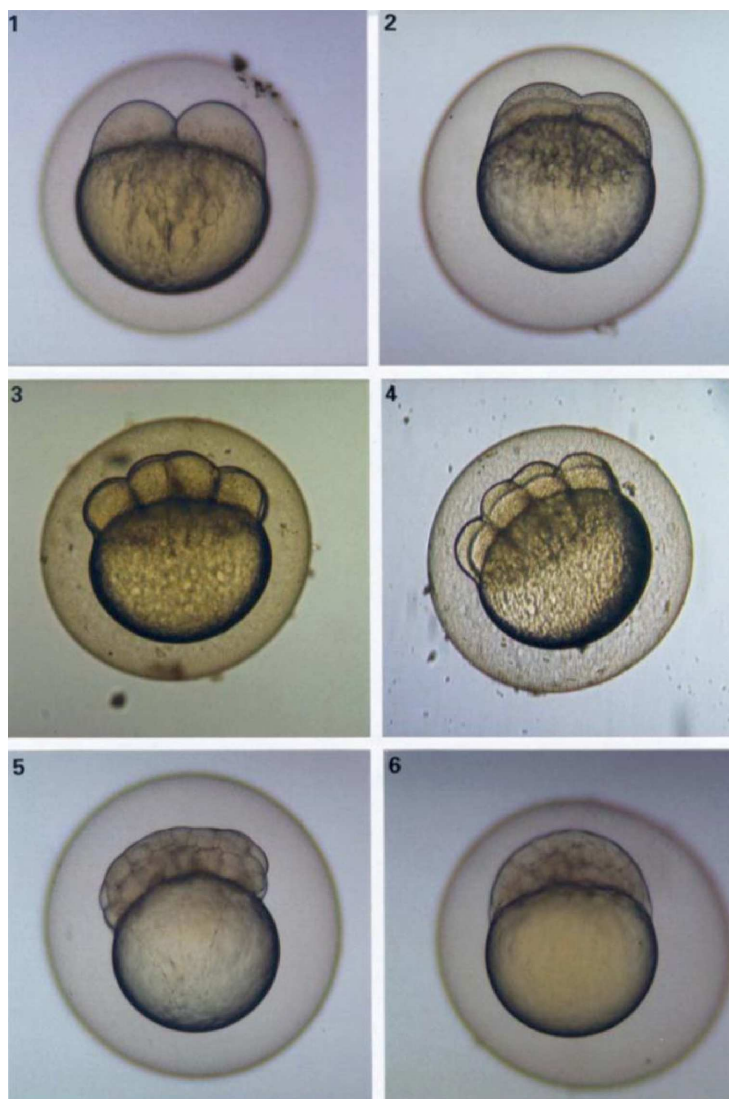
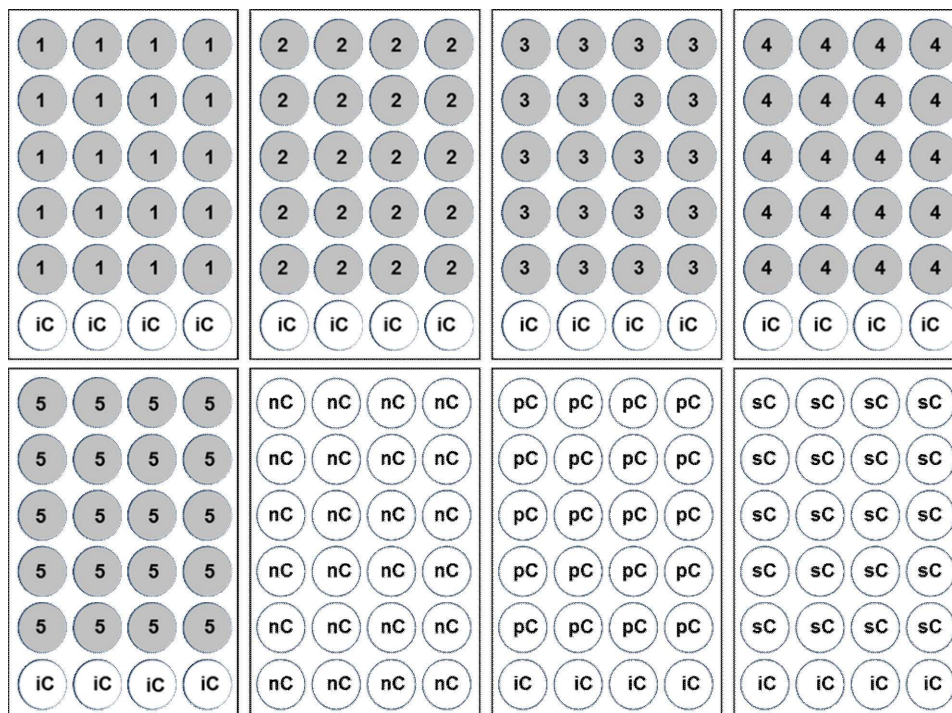


Fig. 3: Normal udvikling hos zebrafiskembryoner (*Danio rerio*): 1) 0,75 timer, 2-cellefase, 2) 1 time, 4-cellefase, 3) 1,2 timer, 8-cellefase, 4) 1,5 timer, 16-cellefase, 5) 4,7 timer, begyndende epiboli og 6) 5,3 timer, ca. 50 % epiboli (fra Braunbeck & Lammer 2006 (40)).

Tillæg 4

Fig. 1

Layout af plader med 24 brønde



1-5 = fem testkoncentrationer/kemikalie;

nC = negativ kontrol (fortyndingsvand),

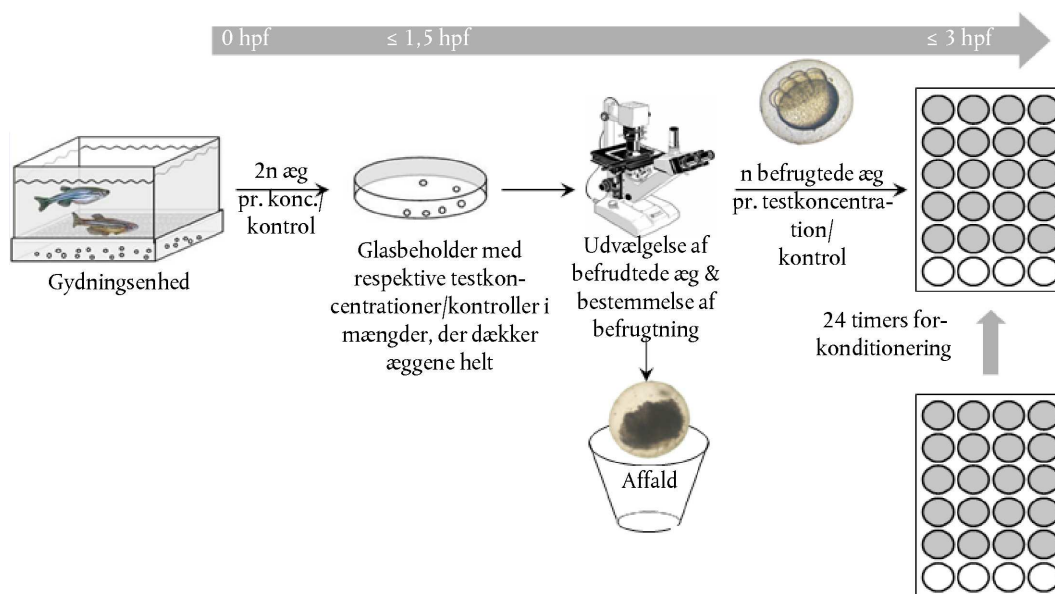
iC = intern pladekontrol (fortyndingsvand)

pC = positiv kontrol (3,4-DCA 4 mg/l);

sC = opløsningsmiddelkontrol

Fig. 2

Oversigt over testproceduren for akut toksicitet for zebrafiskembryoner (fra venstre mod højre): produktion af æg, indsamling af æg, præeksponering umiddelbart efter befrugtning i glasbeholdere, udvælgelse af befrugtede æg med inverteret mikroskop eller kikkert og fordeling af befrugtede æg i plader med 24 brønde med de respektive testkoncentrationer/kontroller, n = antal æg, der kræves pr. testkoncentration/kontrol (her 20), hpf = timer efter befrugtning.



Tillæg 5

OVERSIGT OVER DØDELIGE ENDEPUNKTER FOR TESTEN FOR AKUT TOKSICITET FOR ZEBRAFISKEMBRYONER

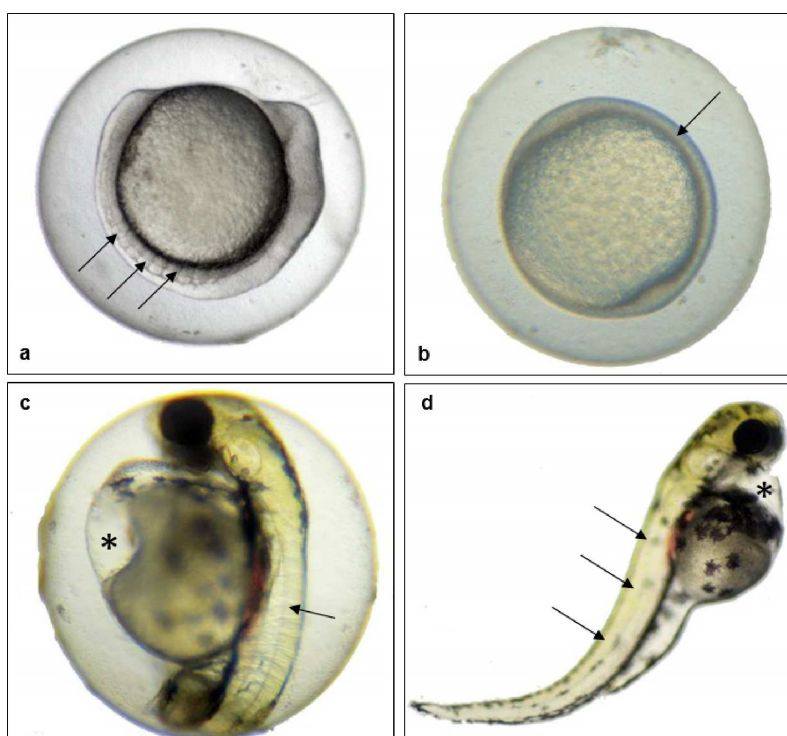
Følgende apikale endepunkter angiver akut toksicitet og dermed død for embryonerne: *koagulering af embryoet, manglende løsning af halen, manglende dannelse af somitter og manglende hjerteslag*. Følgende mikrografer er blevet udvalgt til at illustrere disse endepunkter.

Fig. 1

Koagulering af embryoet

Under lysfeltbelysning viser koagulerede zebrafiskembryoner en række intransparente inklusioner.

Fig. 2

Manglende dannelse af somitter

Selv om udviklingen forsinkes med ca. 10 timer, viser det 24 timer gamle zebrafiskembryon i a) veludviklede somitter (→), mens embryonet i b) ikke viser tegn på dannelse af somitter (→). Selv om det 48 timer gamle zebrafiskembryon i c) klart viser et ødem i blommesækken (*), ses der tydeligt dannelse af somitter (→), mens det 96 timer gamle zebrafiskembryon i d) ikke udviser tegn på dannelse af somitter (→). Bemærk også rygmarvskrumningen (scoliose) og det pericardiale ødem (*) vist i d).

Fig. 3

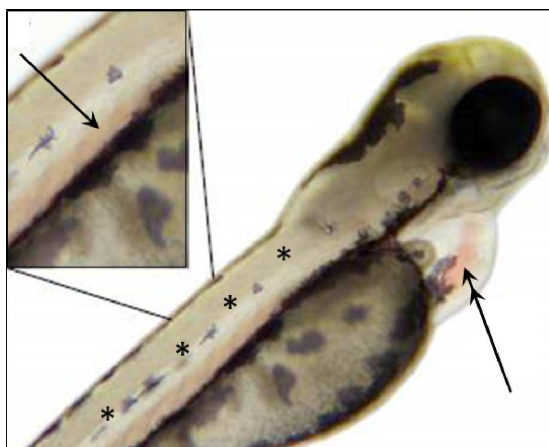
Manglende løsnen af halen i lateral visning



(a: →; 96 timer gammelt zebrafiskembryon). Bemærk også det manglende øje (*).

Fig. 4

Manglende hjerteslag



Manglende hjerteslag er, pr. definition, vanskeligt at illustrere i en mikrograf. Manglende hjerteslag angives med manglende sammentrækninger i hjertet (dobbeltpil). Immobile blodceller i f.eks. aorta abdominalis (→ i indsats) er ikke indikator for manglende hjerteslag. Bemærk også den manglende dannelse af somitter i dette embryon (*, homogent snarere end segmentarisk udseende muskelvæv). Observationstiden for at registrere manglende hjerteslag bør være mindst et minut med en forstørrelse på mindst 80×.

C.50 Toksicitetstest af sedimentfri *Myriophyllum spicatum*

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline) 238 (2014). Den er beregnet til at vurdere toksiciteten af kemikalier for *Myriophyllum spicatum*, en tokimbladet undervandsplante, som er en art i tusindbladsfamilien. Det er baseret på en eksisterende ASTM-forsøgsmetode (1), som er ændret som et sedimentfrit testsystem (2) for at anslå testkemikaliets iboende økotoksicitet (uafhængigt af testkemikaliets fordelingsadfærd mellem vand og sedimenter). Et testsystem uden sediment har lav analytisk kompleksitet (kun i vandfasen), og resultaterne kan analyseres parallelt og/eller sammenlignes med de resultater, der opnås i *Lemna* sp.-tests (3). Derudover betyder de krævede sterile forhold, at virkningerne af mikroorganismer og alger (kemikalieoptagelse/nedbrydning mv.) så vidt muligt kan begrænses. Denne test erstatter ikke andre akvatiske toksicitetstest, men bør derimod supplere dem, så der kan foretages en mere fuldstændig fare- og risikovurdering af vandplanter. Forsøgsmetoden er blevet valideret ved en ringtest (4).
2. Der gives en nærmere beskrivelse af testen med udskiftning af testopløsningen (semistatisk test) og uden udskiftning (statisk). Afhængigt af målsætningen for testen og myndighedernes krav anbefales det at bruge den semistatiske metode, f.eks. til stoffer, der hurtigt forlader opløsningen ved fordampning, adsorption, fotonedbrydning, hydrolyse, udfældning eller bionedbrydning. Nærmere anvisninger er givet i (5). Denne metode gælder for stoffer, som forsøgsmetoden er valideret for (se nærmere oplysninger i ringtestrapporten (4)), eller formuleringer eller kendte blandinger. Hvis en blanding testes, bør dens indhold så vidt muligt identificeres og kvantificeres. Forsøgsmetoden for sedimentfri *Myriophyllum spicatum* supplerer toksicitetstesten for vandsedimentet *Myriophyllum spicatum* (6). Før brug af forsøgsmetoden til lovmæssig test af en blanding bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.

PRINCIP FOR TESTEN

3. Plantekulturer af *Myriophyllum spicatum* (kun i modificeret Andrews-medie, se tillæg 2), som dyrkes kontinuerligt, må dyrkes som monokulturer i forskellige koncentrationer af testkemikaliets over en periode på 14 dage i et sedimentfrit testsystem. Testens formål er at kvantificere kemikalierelevanterede virkninger på den vegetative vækst i dette tidsrum, baseret på vurdering af udvalgte målevariable. Målevariablene er væksten i skuddene i længden, af sidegrene og rødder samt udvikling af frisk- og tørvægt og forøgelse af grenkranse. Desuden tages der hensyn til særlige kvalitative ændringer i testorganismer såsom vanskning eller chlorose og nekrose, som kan ses ved gulnede eller hvide og brune farver. De kemikalierelevanterede virkninger kvantificeres ved, at væksten i testopløsningerne sammenholdes med væksten i kontrollerne, hvorudfra man bestemmer den koncentration, som frembringer en bestemt hæmning på x % af væksthastigheden, og som betegnes EC_x ; " x " kan være en vilkårlig værdi afhængigt af lovkravene, f.eks. EC_{10} , EC_{20} , EC_{50} . Det bør bemærkes, at estimater af EC_{10} - og EC_{20} -værdier kun er pålidelige og relevante i test, hvor variationskoefficienterne i kontrolplanterne falder til under det anslåede effektniveau, dvs. variationskoefficienterne bør være < 20 % for at give et robust skøn af EC_{20} .
4. Både den gennemsnitlige specifikke væksthastighed (anslået ud fra vurderinger af længden af hovedskuddene og tre yderligere målevariable) og udbytte (anslået ud fra den øgede længde af hovedskuddene og tre yderligere målevariable) af ubehandlede og behandlede planter bør bestemmes. Den specifikke væksthastighed (r) og udbyttet (y) anvendes efterfølgende til at bestemme henholdsvis $E_r C_x$ (f.eks. $E_r C_{10}$, $E_r C_{20}$, $E_r C_{50}$) og $E_y C_x$ (f.eks. $E_y C_{10}$, $E_y C_{20}$, $E_y C_{50}$).
5. Derudover kan den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) og nuleffekt-koncentrationen (NOEC) bestemmes statistisk.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

6. Der bør foreligge en tilstrækkeligt følsom analysemetode til kvantitativ bestemmelse af testkemikaliets i testmediet. Af oplysninger om testkemikaliets, der kan være nyttige ved fastsættelse af testbetingelserne, kan nævnes strukturformel, renhed og urenheder, vandopløselighed, stabilitet i vand, lysstabilitet, syrestyrkekonstant (pK_a) fordelingskoefficient octanol/vand (K_{ow}), damptryk og bionedbrydelighed. Vandopløseligheden og damptrykket kan bruges til at beregne Henrys konstant, som angiver, om der kan forventes væsentligt tab af testkemikalie i løbet af testperioden. Derved fås en indikation af, om der bør træffes særlige skridt til at kontrollere sådanne tab. Er oplysningerne om testkemikaliets opløselighed og stabilitet usikre, anbefales det at vurdere disse under testbetingelserne, dvs. med samme næringsmedium, temperatur og belysning som i testen.
7. Kontrollen af testmediets pH-værdi er særlig vigtig, f.eks. ved test af metaller eller stoffer, som er hydrolytisk ustabile. I OECD's vejledning (5) findes der yderligere vejledning i test af kemikalier, hvis fysisk-kemiske egenskaber vanskeliggør testen.

TESTENS GYLDIGHED

8. For at testen skal være gyldig, skal fordoblingstiden for længden af hovedskuddene være mindre end 14 dage. Med de medier og testbetingelser, der er beskrevet i denne forsøgsmetode, kan dette kriterium opfyldes ved at gennemføre testen under statiske eller semistatiske betingelser.
9. Den gennemsnitlige variationskoefficient for udbytte baseret på målinger af vægten af friske skud (dvs. fra testen påbegyndes, til den afsluttes) og de supplerende målevariable (jf. punkt 37) i kontrolkulturerne må ikke overstige 35 % mellem replikaterne.
10. Mere end 50 % af replikaterne af kontrolgruppen holdes sterile i eksponeringsperioden på 14 dage, hvilket betyder, at de er synligt fri for forurening med andre organismer såsom alger, svampe og bakterier (klar opløsning). *Bemærk:* Vejledning i vurdering af sterilitet i ringtestrapport (4).

REFERENCEKEMIKALIE

11. Referencekemikalie(r), f.eks. 3,5-dichlorphenol anvendt i ringtest (4), kan testes som en metode til at kontrollere forsøgsmetoden; på grundlag af ringtestdata ligger de gennemsnitlige EC_{50} -værdier for 3,5-DCP for de forskellige responsvariable (jf. punkt 37-41 i denne forsøgsmetode) mellem 3,2 mg/l og 6,9 mg/l (se ringtestrapporten for oplysninger om konfidensinterval for disse værdier). Det tilrådes, at test af et referencekemikalie finder sted mindst to gange årligt eller, hvis testfrekvensen er lavere, sideløbende med toksicitetsbestemmelsen af et testkemikalie.

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

12. Alt udstyr, der kommer i berøring med testmedierne, bør være udført helt i glas eller andet kemisk inaktivt materiale. Glasapparatur, der anvendes til dyrkning og test, bør være rensat for kemiske kontaminanter, der kan udvaskes i testmediet, og bør være sterilt. Testbeholderne bør være lange nok til, at skuddet i kontrolbeholderne kan vokse i vandfasen uden dog at nå op til overfladen af testmediet ved testens afslutning. Det anbefales at anvende tykvæggede reagensglas af borsilikat uden kant med en indvendig diameter på ca. 20 mm, en længde på ca. 250 mm og aluminiumslukkeapsler.
13. Da det modificerede Andrews-medium indeholder saccharose (der stimulerer væksten af svampe og bakterier), skal testopløsningerne fremstilles under sterile forhold. Alle væsker samt udstyr steriliseres inden brug. Sterilisering sker via behandling med opvarmet luft (210 °C) i fire timer eller autoklavering i 20 minutter ved 121 °C. Desuden skal alle flasker, fade, skåle mv. og andet udstyr underkastes flammebehandling ved en steril arbejdsbænk umiddelbart før brug.

14. Kulturerne og testbeholderne bør ikke opbevares sammen. Dette opnås bedst ved, at klimakamre, inkubatorer eller lokaler er separate. Belysning og temperatur bør kunne reguleres og holdes på et konstant niveau.

Testorganisme

15. *Myriophyllum spicatum* — en tokimbladet undervandsplante — er en art i tusindbladsfamilien. Mellem juni og august stikker diskrete rosa-hvide blomster op over vandoverfladen. Planternes rødder er et system af robuste jordstængler og findes på hele den nordlige halvkugle i eutrofisk, men ikke forurenet og mere kalkholdigt stille vand med mudret underlag. *Myriophyllum spicatum* foretrækker ferskvand, men findes også i brakvand.
16. Til en sedimentfri toksicitetstest skal der anvendes sterile planter. Hvis testlaboratoriet ikke har regelmæssige kulturer af *Myriophyllum spicatum*, kan der indhentes sterilt plantemateriale fra et andet laboratorium, eller der kan hentes (ikke-sterilt) plantemateriale i felten eller fra en kommerciel leverandør; hvis planterne indhentes i felten, bør der foretages en taksonomisk verifikation af arten. Er planterne indsamlet i felten eller leveret af en kommerciel leverandør, bør de steriliseres (1) og opbevares i mindst otte uger i kultur i samme medium, som benyttes til test, før de anvendes. Indsamlingssteder for startkulturer i felten skal være fri for åbenbare forureningskilder. Der bør udvises stor forsigtighed for at sikre, at der indsamles de korrekte arter af *Myriophyllum spicatum* i felten, især i områder, hvor den kan hybridiseres med andre *Myriophyllum*-arter. Hvis de leveres fra et andet laboratorium, skal de opbevares på tilsvarende måde i mindst tre uger. Kilden til plantematerialet og den testede art bør altid rapporteres.
17. De testede planters kvalitet og ensartethed har stor indflydelse på testresultatet, hvorfor de bør udvælges nøje. Der bør anvendes unge, hurtigtvoksende planter uden synlige forandringer eller misfarvning (chlorose). Nærmere oplysninger om klargøring af testorganismen findes i tillæg 4.

Dyrkning

18. For at undgå at skulle vedligeholde kulturerne så ofte (f.eks. når *Myriophyllum*-test ikke påtænkes anvendt i en periode), kan kulturerne opbevares ved reduceret belysning og temperatur ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $20 \pm 2^\circ\text{C}$). En nærmere beskrivelse af dyrkningen er givet i tillæg 3.
19. Mindst 14 til 21 dage før test overføres et tilstrækkeligt antal testorganismer aseptisk til frisk, sterilt medium og dyrkes i 14 til 21 dage under testbetingelserne som en prækultur. Oplysninger om fremstilling af en prækultur findes i tillæg 4.

Testmedium

20. Der anbefales kun et næringsmedium til *Myriophyllum spicatum* i et sedimentfrit testsystem som beskrevet i tillæg 2. Det anbefales at modificere Andrews-medium til dyrkning af og test med *Myriophyllum spicatum* som beskrevet i (1). Fra fem særskilt udarbejdede stamopløsninger tilsat 3 % saccharose fremstilles det modificerede Andrews-medium. Oplysninger om fremstilling af et medium findes i tillæg 2.
21. Der skal anvendes et 10-fold koncentreret, modificeret Andrews-medium til at opnå testopløsninger (ved fortynding hvor det er relevant). Sammensætningen af dette medium er givet i tillæg 2.

Testopløsninger

22. Testopløsninger fremstilles sædvanligvis ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsningerne af testkemikaliet fremstilles normalt ved opløsning af kemikaliet i demineraliseret (dvs. destilleret eller deioniseret) vand. Tilsætning af næringsstoffer opnås ved at anvende 10-fold koncentreret, modificeret Andrews-medium.

23. Stamopløsningerne af testkemikaliet kan steriliseres ved autoklavering ved 121 °C i 20 minutter eller ved sterilfiltrering, forudsat at steriliseringsteknikken ikke denaturerer testkemikaliet. Testopløsninger kan også fremstilles i sterilt demineraliseret vand eller medium under sterile forhold. Der bør tages højde for varmemestabilitet og adsorption på forskellige overflader ved udvælgelsen af sterilisationsproceduren for testkemikaliet stamopløsninger. Derfor anbefales det, at stamopløsningerne fremstilles under sterile forhold, dvs. ved hjælp af sterilt materiale, der kan opløse testkemikaliet under sterile forhold (f.eks. flammesterilisation, laminar strømningskappe mv.) i sterilt vand. Denne teknik til fremstilling af sterile stamopløsninger gælder både stoffer og blandinger.
24. Den højeste testede koncentration af testkemikaliet bør sædvanligvis ikke være større end kemikaliet vandopløselighed under testbetingelserne. For testkemikalier med lav vandopløselighed kan det være nødvendigt at fremstille en koncentreret stamopløsning eller -dispersion af kemikaliet ved hjælp af et organisk opløsnings- eller dispergeringsmiddel for at lette tilsætning af nøjagtige mængder testkemikalie til testmediet og medvirke til, at det dispergeres eller opløses. Brug af sådanne midler bør så vidt muligt søges undgået. Brug af sådanne hjælpeopløsnings- og dispergeringsmidler bør ikke medføre fytotoksisk virkning. Som eksempler på almindeligt anvendte opløsningsmidler, der er uden fytotoksisk virkning i koncentrationer på op til 100 µl/l, kan nævnes acetone og dimethylformamid. Hvis der anvendes et opløsnings- eller dispergeringsmiddel, bør dets slutkoncentration rapporteres og holdes så lav som mulig (≤ 100 µl/l), og der bør være samme koncentration af opløsnings- eller dispergeringsmiddel i alle behandlings- og kontrolgrupper. Nærmere anvisninger kan findes i (5).

Test- og kontrolgrupper

25. Det vil lette valget af passende testkemikaliekoncentrationer, hvis man på forhånd kender til testkemikaliet toksicitet for *Myriophyllum spicatum*, f.eks. fra en test til bestemmelse af dosisinterval. I den endelige toksicitetstest bør der normalt være fem (som i *Lemna*-væksthæmningstesten, kapitel C.26 i dette bilag) til syv testkoncentrationer arrangeret i en geometrisk serie; de bør vælges således, at NOEC og EC₅₀ ligger i intervallet mellem den højeste og laveste koncentration (jf. nedenfor). Kvotienten mellem testkoncentrationerne bør helst ikke være over 3,2, men kan dog være større, når koncentration/respons-kurven er flad. Det bør begrundes, såfremt der anvendes færre end fem koncentrationer. Der bør anvendes mindst fem replikater for hver testkoncentration.
26. Ved fastsættelse af området for testkoncentrationerne (i den indledende test og/eller i den endelige toksicitetstest) bør følgende tages i betragtning:

Ved bestemmelse af en EC_x-værdi bør denne ligge i det område, testkoncentrationerne dækker, for at den skal blive bestemt med et tilstrækkeligt konfidensniveau. Ved beregning af en EC₅₀-værdi bør den højeste testkoncentration således være større end EC₅₀-værdien. Ligger EC₅₀-værdien uden for testkoncentrationernes område, bliver de tilhørende konfidensintervaller store, så det kan blive umuligt at foretage en pålidelig vurdering af modellens statistiske fit.

Hvis målet er at bestemme en LOEC/NOEC-værdi, bør den laveste testkoncentration være så lav, at væksten ikke er væsentligt lavere end i kontrolprøven. Desuden bør den højeste testkoncentration være så høj, at væksten er væsentligt mindre end i kontrolprøven. Er det ikke tilfældet, må testen gentages med et andet koncentrationsområde (medmindre den højeste koncentration svarer til opløselighedsgrænsen eller til den maksimalt krævede grænsekonzentration, f.eks. 100 mg/l).

27. Hver test bør omfatte kontroller med samme næringsmedium, testorganisme (der vælges et så homogent plantemateriale som muligt, friske sidegrene fra prækulturer, forkortet til 2,5 cm fra roden), miljøforhold og procedurer som testbeholderne, men uden testkemikaliet. Hvis der anvendes et opløsnings- eller dispergeringsmiddel, bør der indgå en ekstra kontrolbehandling med samme koncentration af opløsnings-/dispergeringsmiddel som i testbeholderne med testkemikalie. Der bør være mindst 10 replikater kontrolbeholdere (og beholdere med opløsningsmiddel, hvis det er relevant).

28. Hvis der ikke kræves bestemmelse af NOEC, kan testens design ændres, så der er flere forskellige koncentrationer og færre replikater for hver koncentration. Der bør dog være mindst 10 replikater af kontrolprøverne.

Eksponering

29. Friske sidegrene fra prækultur afkortet til 2,5 cm fra roden fordeles tilfældigt i testbeholderne under aseptiske forhold; hver testbeholder bør indeholde en 2,5 cm lang sidegren, der bør have et apikalt meristem i den ene ende. Det valgte plantemateriale bør være af samme kvalitet i hver testbeholder.
30. Testbeholdernes placering i inkubatoren skal være randomiseret for at minimere indflydelsen af rumlige forskelle i lysintensitet eller temperatur. Desuden skal testen enten have blokdesign, eller også skal testbeholderne omplaceres tilfældigt ved hver observation (eller hyppigere).
31. Hvis en indledende stabilitetstest viser, at testkemikaliekoncentrationen ikke kan opretholdes (dvs. den målte koncentration kommer ned under 80 % af den målte startkoncentration) gennem hele testperioden (14 dage), anbefales et semistatisk testregime. Dette gennemføres ved, at planterne eksponeres for friskfremstillede test- og kontrolopløsninger mindst to gange i løbet af testen (f.eks. på dag 7). Hyppigheden af eksponeringen for frisk medium afhænger af testkemikaliets stabilitet. Meget ustabile eller flygtige kemikalier kan kræve hyppigere eksponering, for at koncentrationerne kan holdes tilnærmelsesvis konstante.
32. Eksponeringsscenariet ved påføring på bladene (spray) er ikke omhandlet i denne forsøgsmetode.

Testbetingelser

33. Belysningen bør komme fra lysstofrør med "varmt" eller "køligt hvidt" lys med en styrke i området 100-150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, målt i det fotosyntetisk aktive spektrum (400-700 nm) i punkter med samme afstand fra lyskilden som bunden af testbeholderne (svarende til ca. 6 000-9 000 lux) og med en lys/mørke-cyklus på 16:8 timer. Den anvendte metode til lysdetektion og -måling, specielt den anvendte type sensor, vil påvirke måleværdien. Sfæriske sensorer (som reagerer på lys fra alle vinkler over og under måleplanet) og cosinus-sensorer (som reagerer på lys fra alle vinkler over måleplanet) må foretrækkes frem for retningsbestemte sensorer og vil give højere aflæsninger fra en lyskilde bestående af mange punkter som den her beskrevet.
34. Temperaturen i testbeholderne bør være 23 ± 2 °C. I særlige tilfælde, f.eks. test af ustabile kemikalier eller metaller, må der udvises ekstra opmærksomhed over for pH-afvigelse; pH-værdien bør ligge på 6-9. Nærmere vejledning er givet i (5).

Varighed

35. Testen afsluttes 14 dage efter, at planterne er overført til testbeholderne.

Målinger og analytiske bestemmelser

36. Ved testens begyndelse har testorganismens hovedskud en længde på 2,5 cm (jf. punkt 29); den måles med en lineal (jf. tillæg 4) eller ved fotografering og billedanalyse. Længden af testorganismens hovedskud med normalt og unormalt udseende bestemmes ved testens begyndelse, mindst en gang i løbet af den 14 dage lange eksponeringsperiode samt ved testens afslutning. Bemærk: Som et alternativ for dem, som ikke har billedanalyse, kan der, hvis arbejdsbænken steriliseres, inden planterne tilsættes testbeholdere, også bruges en steril lineal til at måle længden af hovedskuddet ved testens begyndelse og under testen. Ændringer i planternes udvikling, f.eks. deformede skud, udseende, tegn på nekrose, chlorose, opbrydning eller tab af flydeevne, samt i røddernes længde og udseende, bør registreres. Særlige kendetegn ved testmediet (f.eks. ikke-opløst materiale i testbeholderen eller algevækst, svampe eller bakterier på denne) bør ligeledes registreres.

37. Foruden at længden af hovedskuddet registreres under testen, bør testkemikaliets virkninger på tre (eller flere) af følgende målevariable også vurderes:

- i. Samlede længde af sidegrene
- ii. Samlet længde af skud
- iii. Samlet længde af rødder
- iv. Friskvægt
- v. Tørvægt
- vi. Antal grenkranse

Bemærkning 1: De observationer, der er gjort i fortesten, vil kunne bidrage til at udvælge relevante yderligere målinger blandt de seks variable, der er anført ovenfor.

Bemærkning 2: Det er i høj grad ønskeligt, at frisk- og tørvægt (parameter iv og v) fastslås.

Bemærkning 3: Da saccharose og lys (hvis rødderne eksponeres for lys under testen) kan påvirke transportører af auxin (plantens væksthormon), og nogle kemikalier kan have en virkningsmekanisme af auxintypen, er optagelsen af rodens endepunkter (parameter iii) tvivlsom.

Bemærkning 4: Resultaterne af ringtesten viser høje variationskoefficienter ($> 60\%$) for den samlede længde af sidegrene (parameter i). Den samlede længde af sidegrene ligger under alle omstændigheder inden for målingen af det samlede hovedskud (parameter ii), som viser mere acceptable variationskoefficienter på $< 30\%$.

Bemærkning 5: Som følge af ovenstående anbefales følgende hovedmålinger af endepunkter: samlet længde af skud, frisk- og tørvægt (parameter ii, iv og v); parameter vi — antal grenkranse — overlades til forskerens afgørelse.

38. Fordelen ved at bruge længden af hovedskud og antal grenkranse er, at de kan bestemmes for hver test- og kontrolbeholder ved begyndelsen af, under og ved afslutningen af testen med fotografering og billedanalyse, selv om der også kan anvendes en (steril) lineal.

39. Den samlede længde af sidegrene, den samlede længde af roden (som summen af alle sidegrene eller rødder) og den samlede længde af skuddene (som summen af længden af hovedskuddene og længden af de sidegrene) kan måles med en lineal i slutningen af eksponeringen.

40. Tør- og/eller friskvægten bør bestemmes ved testens start på en prøve af prækulturen, der er repræsentativ for den, der anvendes til at begynde testen, samt ved testens slutning med plantemateriale fra hver test- og kontrolbeholder.

41. Samlet længde af sidegrene, samlet længde af skud, samlet længde af rødder, friskvægt, tørvægt og antal grenkranse kan bestemmes som følger:

- i. Samlet længde af sidegrene: Længden af sidegrene kan bestemmes ved at måle alle sidegrene med en lineal i slutningen af eksponeringen. Den samlede længde af sidegrene er summen af alle sidegrene for hver test- og kontrolbeholder.
- ii. Samlet længde af skud: Længden af hovedskuddet kan bestemmes ved billedanalyse eller ved hjælp af en lineal. Den samlede længde af skuddene er summen af den samlede længde af sidegrene og den samlede længde af hovedskuddet for hver test- og kontrolbeholder i slutningen af eksponeringen.

- iii. Samlet længde af rødder: Længden af rødderne kan bestemmes ved at måle alle rødder med en lineal i slutningen af eksponeringen. Den samlede længde af rødderne er summen af alle rødderne for hver test- og kontrolbeholder.
- iv. Friskvægt: Friskvægten kan bestemmes ved at veje testorganismene i slutningen af eksponeringen. Alt plantemateriale for hver test- og kontrolbeholder skylles med destilleret vand og dubbes tørt med cellulosepapir. Herefter bestemmes friskvægten ved vejning. Startbiomassen (friskvægten) bestemmes på grundlag af en prøve af testorganismer, der tages fra samme parti som det, der er anvendt til at pøde testbeholderne.
- v. Tørvægt: Efter forberedelserne til bestemmelse af friskvægten tørres testorganismene ved 60 °C til en konstant vægt. Denne masse er tørvægten. Startbiomassen (tørvægten) bestemmes på grundlag af en prøve af testorganismer, der tages fra samme parti som det, der er anvendt til at pøde testbeholderne.
- vi. Antal grenkranse: Alle grenkranse tælles ud langs hovedskuddet.

Hyppighed af målinger og analytiske bestemmelser

- 42. Hvis testen udføres statisk, bør pH-værdien for hver behandling måles ved testens start og afslutning. Udføres testen semistatisk, bør der foretages pH-måling på hver portion "frisk" testopløsning før hver udskiftning foruden på de tilsvarende "brugte" opløsninger.
- 43. Lysintensiteten bør måles i væstkammeret, inkubatoren eller lokalet i punkter med samme afstand til lyskilden som testorganismen. Målingerne bør foretages mindst en gang i løbet af testen. Mindst en gang dagligt bør temperaturen af mediet i en surrogatbeholder, der opbevares ved samme betingelser i klimakammeret, inkubatoren eller lokalet (eller kontinuerligt med en datalogger) måles.
- 44. Under testen bestemmes testkemikaliekoncentration(er) med passende intervaller. Mindstekravet i statistiske test er bestemmelse af koncentrationerne ved testens begyndelse og afslutning.
- 45. I semistatiske test, hvor testkemikaliekoncentrationen ikke forventes at forblive inden for ± 20 % af den nominelle koncentration, er det nødvendigt at analysere alle friskfremstillede testopløsninger, og de samme opløsninger analyseres ved hver udskiftning. For de test, hvor den målte startkoncentration af testkemikallet ikke ligger inden for ± 20 % af den nominelle værdi, men hvor der kan fremlægges tilstrækkelig dokumentation for, at startkoncentrationerne er repeterbare og stabile (dvs. inden for området 80-120 % af startkoncentrationen), kan det godtages, at der kun foretages kemisk bestemmelse af den højeste og laveste testkoncentration. I alle tilfælde behøver testkoncentrationen før udskiftning kun bestemmes på en testbeholderreplikant ved hver testkoncentration (eller på indholdet af de poolerede beholdere for hver replikat).
- 46. Hvis det kan konstateres, at testkoncentrationen har været holdt tilfredsstillende inden for ± 20 % af den nominelle eller målte startkoncentration under hele testen, kan analysen af resultaterne baseres på nominelle eller målte startværdier. Er afvigelsen fra den nominelle eller målte startkoncentration større end ± 20 %, bør analysen af resultaterne baseres på den geometriske middelsoncentration under eksponeringen eller på modeller, der beskriver faldet i testkemikaliekoncentrationen (5).

Grænsetest

- 47. Under visse omstændigheder, f.eks. når en indledende test viser, at testkemikallet er uden toksiske virkninger i koncentrationer på op til 100 mg/l, dog ikke over kemikallets opløselighed i testmediet eller i tilfælde af en formulering op til grænsen af dens dispergeringsevne, kan der udføres en grænsetest, hvor responsen i en kontrolgruppe sammenholdes med responsen i en behandlingsgruppe (100 mg/l eller en koncentration lig med opløselighedsgrænsen). Det anbefales kraftigt, at dette understøttes ved analyse af eksponeringskoncentrationen. Alle de beskrevne testbetingelser og validitetskriterier finder anvendelse på en grænsetest bortset fra, at antallet af behandlingsreplikater bør fordobles. Væksten i kontrol- og behandlingsgruppen kan analyseres med en statistisk test til sammenligning af middelværdier, f.eks. Students t-test.

DATA OG RAPPORTERING

Responsvariable

48. Testens formål er at bestemme testkemikaliet virkninger på den vegetative vækst af *Myriophyllum spicatum*. Denne forsøgsmetode beskriver to responsvariable.
- Gennemsnitlig specifik væksthastighed: Denne responsvariabel beregnes på grundlag af den logaritmiske ændring i længden af hovedskuddet samt den logaritmiske ændring i andre måleparametre (samlet længde af skud, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse) med tiden (udtrykt pr. dag) i kontrollerne og i hver behandlingsgruppe. Bemærkning: For måleparameteren samlet længde af sidegrene og samlet længde af rødder er det ikke muligt at foretage en beregning af den gennemsnitlige specifikke væksthastighed. Ved testens begyndelse har testorganismen ingen sidegrene og ingen rødder (baseret på fremstillingen af prækulturen); fra værdien nul er beregningen af den gennemsnitlige specifikke væksthastighed ikke defineret.
 - Udbytte: Denne responsvariabel beregnes på grundlag af den logaritmiske ændring i længden af hovedskuddet samt ændringer i andre måleparametre — dvs. helst samlet længde af skud, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse og andre parametre, hvis dette anses for at være nyttigt — i kontrollerne og i hver behandlingsgruppe indtil slutningen af testen.
49. Toksicitetsvurderinger bør baseres på længden af hovedskud og tre yderligere målevariable (dvs. helst samlet længde af skud, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse, jf. punkt 37 og bemærkning 2, 4 og 5 til dette punkt), fordi visse kemikalier kan påvirke andre målevariable langt mere end længden af hovedskuddet. Denne virkning ville ikke blive opdaget ved alene at benytte længden af hovedskuddet i beregningen.

Gennemsnitlig specifik væksthastighed

50. Den gennemsnitlige specifikke væksthastighed for en given periode beregnes som den logaritmiske stigning i vækstvariablene — længden af hovedskud og tre yderligere målevariable (dvs. samlet længde af skud, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse) — ved hjælp af nedenstående formel for hver replikat af kontrol og behandlingsprøve:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

hvor:

μ_{i-j} er den gennemsnitlige specifikke væksthastighed i tidsrummet fra i til j

N_i er værdien af målevariablen i test- eller kontrolbeholderen til tiden i

N_j er værdien af målevariablen i test- eller kontrolbeholderen til tiden j

t er tidsrummet fra i til j

For hver behandlings- og kontrolgruppe beregnes en gennemsnitlig væksthastighed samt estimer for variansen.

51. Den gennemsnitlige specifikke væksthastighed bør beregnes for hele testperioden (tiden "i" i ovenstående formel er testens starttid, og tiden "j" er testens sluttid). For hver testkoncentration og kontrol beregnes en gennemsnitsværdi af den specifikke væksthastighed samt estimer for variansen. Derudover bør der foretages en trinvis beregning af væksthastigheden for at vurdere testkemikaliet virkninger i eksponeringsperioden (f. eks. ved betragtning af logaritmisk transformeret vækstkurver).

52. Hæmningen i procent af væksthastigheden (I_r) kan derefter beregnes for hver testkoncentration (behandlingsgruppe) ved hjælp af følgende formel:

$$\%I_r = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100$$

hvor:

$\% I_r$ er procent hæmning af den gennemsnitlige specifikke væksthastighed

μ_c er gennemsnitsværdien af μ i kontrolgruppen

μ_T er gennemsnitsværdien af μ i behandlingsgruppen

Udbytte

53. Virkningerne på udbyttet bestemmes på grundlag af målevariablen længden af hovedskud og tre yderligere målevariable (dvs. helst samlet længde af skud, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse) i hver testbeholder ved testens start og slutning. For frisk- eller tørvægten bestemmes startbiomassen på grundlag af en prøve af testorganismer, der tages fra samme parti som det, der er anvendt til at pøde testbeholderne. For hver testkoncentration og kontrol beregnes en gennemsnitsværdi af udbyttet samt estimater for variansen. Udbyttehæmningen i procent ($\% I_y$) kan beregnes for hver behandlingsgruppe som følger:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

hvor:

$\% I_y$ er udbyttereduktionen i procent

b_c er slutbiomasse minus startbiomasse for kontrolgruppen

b_T er slutbiomasse minus startbiomasse for behandlingsgruppen

Fordoblingstid

54. Til bestemmelse af fordoblingstiden (T_d) for længden af hovedskuddet og overensstemmelse med dette validitetskriterium (jf. punkt 8) anvendes følgende formel på de data, der er indsamlet for kontrolbeholderne:

$$T_d = \ln 2 / \mu$$

hvor μ er den gennemsnitlige specifikke væksthastighed, der bestemmes som beskrevet i punkt 50-52.

Optegning af koncentration/respons-kurver

55. Der bør afsættes koncentration/respons-kurver over sammenhængen mellem den gennemsnitlige hæmningsprocent for responsvariablene (I_r eller I_y , beregnet som vist i punkt 53) og logaritmen for testkemikaliekoncentrationen.

Beregning af EC_x

56. Estimaterne for EC_x bør baseres på gennemsnitsværdien dels af specifik væksthastighed ($E_r C_x$), dels af udbytte ($E_y C_x$), der hver især bør baseres på længden af hovedskud og eventuel yderligere målevariable (dvs. helst samlet længde af skud, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse). Dette skyldes, at der findes kemikalier med virkning på længden af hovedskuddet og på de øvrige målevariable. Som parametre for toksicitet er der derfor fire EC_x -værdier for hvert beregnet hæmningsniveau x : $E_r C_x$ (længde af hovedskud), $E_r C_x$ (dvs. helst den samlede længde af skud, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse), $E_y C_x$ (længde af hovedskud) og $E_y C_x$ (dvs. helst samlet længde af skud, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse).

57. Det bør bemærkes, at EC_x -værdier beregnet ved hjælp af disse to responsvariable ikke er sammenlignelige, og denne forskel haves for øje ved anvendelse af testens resultater. EC_x -værdier baseret på gennemsnitlig specifik væksthastighed ($E_r C_x$) vil i de fleste tilfælde være højere end resultater baseret på udbytte ($E_y C_x$), når testbetingelserne i denne forsøgsmetode er overholdt, hvilket følger af det matematiske grundlag for de to beregningsmåder. Denne forskel bør ikke opfattes som en forskel i følsomhed mellem de to responsvariable, men kun, at der er tale om to matematisk forskellige størrelser.

Statistiske metoder

58. Målet er at formulere en kvantitativ koncentrations/respons-sammenhæng ved hjælp af regressionsanalyse. Der kan anvendes vægtet lineær regression efter forudgående lineariserende transformation af responsdataene — f. eks. med probit-, logit- eller Weibull-modeller (7), men det må foretrækkes at benytte ikke-lineære regressionsmetoder, da de bedre håndterer de uundgåelige uregelmæssigheder i data og afvigelser fra jævne fordelinger. I området tæt på ingen hæmning eller total hæmning kan sådanne uregelmæssigheder blive forstørret af transformationen og derved forstyrre analysen (7). Det bør bemærkes, at standardanalysemetoder, hvor der bruges probit-, logit- eller Weibull-transformerede variable, er bestemt til brug på binære data (f.eks. død eller overlevelse) og bør modificeres for at kunne benyttes til data for væksthastighed eller udbytte. Særlige metoder til bestemmelse af EC_x -værdier ud fra kontinuertlige data findes i henvisning (8) (9) (10).
59. For hver responsvariabel, der skal analyseres, anvendes koncentrations/respons-forholdet til at beregne punkttestimater for EC_x -værdier. Når det er muligt, bør der bestemmes 95 % konfidensgrænser for hvert estimat. Responsdataenes grad af egnethed til regressionsmodellen bør vurderes enten grafisk eller statistisk. Regressionsanalysen bør foretages ud fra responsværdierne for de enkelte replikater, ikke gruppegennemsnit.
60. Hvis de tilgængelige regressionsmodeller eller -metoder er uegnede til dataene, kan estimater og konfidensgrænser for EC_{50} desuden fås ved lineær interpolation med bootstrapping (10).
61. Til beregning af et estimat for LOEC og dermed NOEC må middelværdierne for behandlingerne sammenholdes ved hjælp af variansanalyse. Gennemsnittet for hver koncentration sammenholdes derefter med gennemsnittet for kontrollerne ved hjælp af en egnet multisammenlignings- eller trend test-metode. Dunnetts eller Williams' test kan eventuelt bruges (12) (13) (14) (15) (16). Det skal vurderes, om variansanalysens forudsætning om varianshomogenitet er opfyldt. Denne vurdering kan foretages grafisk eller ved en formel test (15). Hertil kan Levenes eller Bartlett's test anvendes. Manglende opfyldelse af forudsætningen om varianshomogenitet kan undertiden afhjælpes ved logaritmisk transformation af dataene. Hvis variansen er ekstremt heterogen og ikke kan korrigeres ved transformation, bør analyse med step-down Jonkheere trend test overvejes. Der er supplerende vejledning for bestemmelse af NOEC i (10).
62. Den senere tids videnskabelige udvikling har ført til en anbefaling om, at NOEC-begrebet afskaffes og erstattes med regressionsbaserede punkttestimater for EC_x . Der er ikke fastlagt en passende værdi af x til denne *Myriophyllum*-test. Et område på 10 til 20 % synes imidlertid at være passende (afhængigt af den valgte responsvariabel), og det bør foretrækkes at rapportere både EC_{10} og EC_{20} og deres konfidensgrænser.

Rapportering

63. Testrapporten indeholder følgende:

Testkemikalie

Stof med kun en bestanddel:

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

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

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer eller blandinger:

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

Testarter

- Videnskabeligt navn og kilde

Testbetingelser

- Den anvendte forsøgsmetode (statisk, eller semistatisk).
- Startdato og varighed for testen.
- Testmedium.
- Beskrivelse af testens design: testbeholdere og låg, opløsningsvolumener, længden af hovedskud pr. testbeholder ved testens start.
- Testkoncentrationer (nominelle eller målte) og antal replikater for hver koncentration.
- Metoder til fremstilling af stam- og testopløsninger, herunder eventuelle opløsnings- og dispergeringsmidler.
- Testtemperaturen.
- Lyskilde, lysintensitet og -homogenitet.
- PH-værdierne af test- og kontrolmedierne.
- Analysemetoder for testkemikalien med fyldestgørende oplysninger om kvalitetsvurdering (valideringsundersøgelser, standardafvigelser eller konfidensgrænser for analyserne).
- Metoder til bestemmelse af længden af hovedskud og andre målevariable, f.eks. samlet længde af sidegrene, samlet længde af skud, samlet længde af rødder, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse.
- Kulturen (steril eller ikke-steril) i hver test- og kontrolbeholder ved hver observation.
- Alle fravigelser fra denne forsøgsmetode.

Resultater

- Rådata: længden af hovedskud og andre målevariable i hver test- og kontrolbeholder ved hver observation og hver analyse.
- Gennemsnit og standardafvigelse for hver målevariabel.
- Vækstkurver for hver målevariabel.
- Beregnede responsvariable for hver behandlingsreplikant, med gennemsnitsværdier og variationskoefficient for replikaterne.
- Grafisk fremstilling af sammenhængen mellem koncentration og virkning.
- Estimer for toksicitetsendepunkter for responsvariablene, f.eks. EC_{50} , EC_{10} , EC_{20} , med tilhørende konfidensintervaller. LOEC og/eller NOEC (hvis disse er beregnet) og de statistiske metoder, der anvendt til at beregne dem.
- Hvis variansanalyse er anvendt, størrelsen af den virkning, det er muligt at påvise (f.eks. mindste signifikante forskel).
- Enhver vækststimulation, der er fundet ved nogen behandling.
- Ethvert visuelt tegn på fytotoksicitet samt observationer af testopløsningerne.
- Diskussion af resultaterne, herunder den eventuelle betydning af fravigelser fra denne forsøgsmetode for resultaterne.

LITTERATUR

- 1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.
- 2) Maletzki, D. *et al.* (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch*, No. 22, pp. 702–710.
- 3) Kapitel C.26 i dette bilag: *Lemna sp.* Væksthæmningstest.
- 4) OECD (2014), “*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, No. 205, OECD Publishing, Paris.
- 5) OECD (2000), “Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.
- 6) Kapitel C.51 i dette bilag: Toksicitetstest af vandsedimentet *myriophyllum spicatum*.
- 7) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.
- 8) Nyholm, N. *et al.* (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/2, pp. 157-167.
- 9) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, pp. 1485-1494.
- 10) OECD (2006), “Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.
- 11) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.
- 12) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.
- 13) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.
- 14) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.
- 15) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.
- 16) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, pp. 93-96.

Tillæg 1

DEFINITIONER

Biomasse: frisk- og/eller tørvægten af det levende materiale, som er til stede i en population. I denne test er biomasse summen af hovedskud, alle sidegrene og alle rødder.

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Chlorose: farveændringen fra grøn til gul i testorganismen, især i grenkranse.

Ec_x: den koncentration af testkemikaliets, som er opløst i testmediet, der resulterer i en reduktion på x % (f. eks. 50 %) i væksten i *Myriophyllum spicatum* inden for en fastlagt eksponeringstid (som udtrykkeligt skal angives, hvis den adskiller sig fra den fulde eller normale testperiode). For klart at skelne mellem EC-værdier afledt af henholdsvis væksthastighed og udbytte anvendes betegnelsen »E_rC« for væksthastighed (rate) og »E_yC« for udbytte (yield), efterfulgt af den anvendte målevariabel, f.eks. E_rC (længde af hovedskud).

Vækst: stigning i målevariablen, f.eks. længde af hovedskud, samlet længde af sidegrene, samlet længde af skud, samlet længde af rødder, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse i testperioden.

Væksthastighed (gennemsnitlig specifik væksthastighed): den logaritmiske forøgelse i målevariablen i eksponeringsperioden. *Bemærk:* Væksthastighedsrelaterede responsvariable er uafhængige af testens varighed, så længe vækstmønsteret for ueksponerede organismer er eksponentiel.

Laveste koncentration med observeret effekt (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC): den laveste testede koncentration, ved hvilken kemikaliets har vist statistisk signifikant ($p < 0,05$) vækstnedsættende virkning i forhold til kontrollerne inden for en given eksponeringsperiode. Imidlertid skal alle undersøgte koncentrationer, der ligger over LOEC, have haft en skadelig virkning, som er større end eller lig med den, som er observeret ved LOEC. Er disse to betingelser ikke opfyldt, bør der fyldestgørende redegøres for, hvordan den pågældende LOEC (og dermed NOEC) er valgt.

Målevariabel: enhver type variabel, der måles for at udtrykke endepunktet for en test ved hjælp af en eller flere forskellige responsvariable. Målevariable i denne forsøgsmetode er længden af hovedskud, samlet længde af sidegrene, samlet længde af skud, samlet længde af rødder, friskvægt, tørvægt og antal grenkranse.

Monokultur: en kultur med en planteart.

Nekrose: dødt (dvs. hvidt eller mørkebrunt) væv fra testorganismen.

Koncentration uden statistisk sikkert observeret effekt (NOEC): testkoncentrationen lige under LOEC.

Responsvariabel: en variabel, som anvendes til vurdering af den toksiske virkning og er afledt af vilkårlige målevariable, der beskriver biomassen ved andre beregningsmetoder. I nærværende forsøgsmetode er væksthastighed og udbytte responsvariable, der er afledt af målevariable som længde af hovedskud, samlet længde af skud, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse.

Semistatisk test (udskiftningstest): en test, hvor testopløsningen udskiftes med bestemte intervaller i løbet af testen.

Statisk test: en forsøgsmetode, hvor testopløsningen ikke udskiftes under testen.

Testkemikalie: stoffer eller blandinger, der testes med denne forsøgsmetode.

Endepunkt for en test: den generelle faktor, som testkemikaliets fremkalder en ændring af i forhold til kontrollen som mål for testen. I denne forsøgsmetode er endepunktet væksthæmning, som kan udtrykkes ved forskellige responsvariable, der er baseret på en eller flere målevariable.

Testmedium: det komplette, syntetiske næringsmedium, hvorpå testplanterne vokser, når de eksponeres for testkemikallet. Normalt er testkemikallet opløst i testmediet.

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

Udbytte: værdien af en målev variabel for biomasse ved eksponeringsperiodens slutning minus værdien af samme variabel ved eksponeringsperiodens start. Bemærkning: Når vækstmønsteret for ueksponerede organismer er eksponentiel, falder udbyttebaserede responsvariable med testperioden.

Tillæg 2

MODIFICERET ANDREWS-MEDIUM TIL STAMKULTUR OG PRÆKULTUR

Det modificerede Andrews-medium, som skal bruges til stamkulturen og prækulturen, fremstilles af fem særskilt fremstillede næringsstamløsninger tilsat 3 % saccharose.

Tabel 1

Sammensætning af Andrews-næringsopløsning: (ASTM-betegnelse E 1913-04)

Fremstilling af stamløsninger af næringsstoffer			Fremstilling af næringsopløsninger
Stamløsning	Kemikalie	Startvægt pr. 1 000 ml	Ml pr. 5 l næringsopløsning
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO ₃	8,08 g	
	(Ca(NO ₃) ₂ * 4 H ₂ O	18,88 g	
2	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	9,86 g	50
3	Se nedenstående stamløsning 3.1		50
4	KH ₂ PO ₄	2,72 g	50
5	FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0,278 g	50
	Na ₂ EDTA* 2 H ₂ O	0,372 g	

Stamløsninger kan opbevares i køleskab i seks måneder (ved 5-10 °C). Kun stamløsning nr. 5 har en begrænset holdbarhed (to måneder).

Tabel 2

Fremstilling af stamløsning 3.1 til fremstilling af stamløsning 3

Kemikalie	Startvægt g/100 ml
MnSO ₄ × 4 H ₂ O	0,223
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,115
H ₃ BO ₃	0,155
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,0125
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4 H ₂ O	0,0037

Efter at have fremstillet stamløsning 3.1 (tabel 2) fryses denne opløsning i ca. 11 ml-aliquoter (ved mindst – 18 °C). De frosne portioner har en holdbarhed på fem år.

For at fremstille stamopløsning 3: Optø stamopløsning 3.1, fyld 10 ml i en 1-liters målekolbe, og tilsæt ultrarent vand op til kolbens markering.

For at få modificeret Andrews-medium: Fyld ca. 2 500 ml ultrarent vand i en 5-litersmålekolbe. Tilsæt 50 ml af hver stamopløsning, og fyld derefter 90 % af målekolben med ultrarent vand og indstil pH-værdien til 5,8.

Tilsæt derefter 150 g opløst saccharose (3 % pr. 5 l), og fyld målekolben med ultrarent vand op til markeringen. Fyld til sidst næringsopløsningen i 1-liters Schott-kolber, og autoklaver ved 121 °C i 20 minutter.

Den udledte næringsopløsning kan holdes steril i køleskab (ved 5-10 °C) i tre måneder.

Modificeret Andrews-medium til sedimentfri toksicitetstest

Ud af de fem stamopløsninger med næringsstoffer, som allerede er nævnt i tabel 1 og 2, fremstilles 10-fold koncentreret, modificeret Andrews-medium, som skal bruges til at opnå testopløsningerne, tilsat 30 % saccharose. For at gøre dette: Fyld ca. 100 ml ultrarent vand i en 1-litersmålekolbe. Tilsæt 100 ml af hver af stamopløsningerne, og indstil pH-værdien til 5,8. Tilsæt derefter 30 % opløst saccharose (300 g pr. 1 000 ml), og fyld målekolben med ultrarent vand op til markeringen.

Fyld til sidst næringsopløsningen i 0,5-liters Schott-kolber, og autoklaver ved 121 °C i 20 minutter.

Den udledte 10-fold koncentrerede næringsopløsning kan holdes steril i køleskab (ved 5-10 °C) i tre måneder.

Tillæg 3

VEDLIGEHODELSE AF STAMKULTUREN

I dette tillæg 3 beskrives stamkulturen for *Myriophyllum spicatum* L.⁽¹⁾, en tokimbladet undervandsplante, som er en art i tusindbladsfamilien. Mellem juni og august stikker diskrete rosa-hvide blomster op over vandoverfladen. Planternes rødder er et system af robuste jordstængler og findes på hele den nordlige halvkugle i eutrofisk, men ikke forurenset og mere kalkholdigt stille vand med mudret underlag. *Myriophyllum spicatum* foretrækker ferskvand, men findes også i brakvand.

Til sedimentfri stamkultur under laboratorieforhold skal der anvendes sterile planter. Sterile planter fås fra det økotosikologiske laboratorium i den tyske Umweltbundesamt (den tyske miljøstyrelse).

Alternativt kan testorganismer fremstilles af ikke-sterile planter i overensstemmelse med ASTM-betegnelsen E 1913-04. Se nedenfor — hentet fra ASTM Standard Guide — proceduren for dyrkning af *Myriophyllum sibiricum* indsamlet i felten:

»Hvis udgangspunktet er ikke-sterile planter indsamlet i felten, indsamles skud fra *M. sibiricum* i efteråret. Anbring skuddene i et 20-liters akvarium med 5 cm steril sediment som er dækket af kvartssand eller f.eks. af Turface® og 18 l reagensvand. Beluft akvariet, og hold en temperatur på 15 °C og en fluenshastighed på 200 til 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i 16 timer pr. dag. Plantekulturen i akvariet kan opretholdes som backup for planterne, hvis de sterile plantekulturer ødelægges ved en mekanisk fejl i vækstskammeret, forurening eller anden årsag. De planter, der dyrkes i akvariet, er ikke sterile, og sterile kulturer kan ikke vedligeholdes i et batchdyrkningsystem. For at sterilisere kulturen fjernes planterne fra akvariet og skylles under rindende deioniseret vand i ca. 0,5 timer. Under aseptiske forhold i et laminar airflow-kammer desinficeres planterne i mindre end 20 minutter (indtil det meste plantevæv er bleget, og kun det voksende toppunkt stadig er grønt) i en 3 % (vægt/volumen) natriumhypochloritopløsning indeholdende 0,01 % af et passende overfladeaktivt stof. Omrør desinfektionsmiddel og plantemateriale. Segmenter med flere knuder overføres til sterile dyrkningsrør indeholdende 45 ml steriliseret modificeret Andrews-medium og med almindelige lukninger til dyrkningsrør. Der anbringes kun et plantesegment i hver testbeholder. Laboratoriets tætningsfilm anvendes til at fastgøre lukningen til dyrkningsbeholderen. Når der er etableret en steril kultur, bør der overføres plantesegmenter indeholdende flere knuder til nye testbeholdere med friske flydende næringsmedier hver 10 til tolv dage. Som påvist ved dyrkning på agarplader skal planterne være sterile og forblive sterile i otte uger, inden test kan iværksættes.«

Da det modificerede Andrews-medium indeholder saccharose (som stimulerer væksten af svampe og bakterier), skal alle materialer, opløsninger og kulturer fremstilles under sterile forhold. Alle væsker samt udstyr steriliseres inden brug. Sterilisering sker via behandling med opvarmet luft (210 °C) i fire timer eller autoklavering i 20 minutter ved 121 °C. Desuden skal alle flasker, fade, skåle mv. og andet udstyr underkastes flammebehandling ved en steril arbejdsbænk umiddelbart før brug.

Ved reduceret belysning og lavere temperatur (50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 20 $\pm$ 2 °C) kan stamkulturer holdes i længere tid uden at skulle gendannes. Næringsmediet til *Myriophyllum* bør være det samme som det, der anvendes ved test, men andre næringsrige medier kan anvendes til stamkulturer.

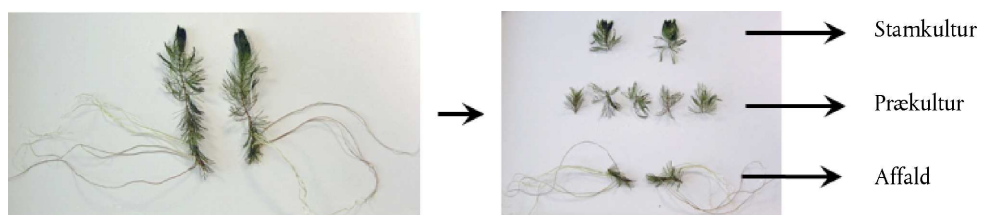
Plantesegmenterne fordeles axenisk i flere 500-ml-Erlenmeyer- og/eller 2 000-ml-Fernbach-kolber fyldt med henholdsvis ca. 450 eller 1 000 ml modificeret Andrews-medium. Derefter tilproppes kolberne axenisk med en celluloseprop.

Desuden er det nødvendigt at foretage en grundig flammebehandling af udstyret ved den sterile arbejdsbænk umiddelbart før brug. Afhængigt af antal og størrelse overføres planterne til frisk næringsopløsning ca. hver tredje uge.

Toppen samt segmenter af stammens midterste del kan anvendes til denne nye kultur. Antal og størrelse af de overførte planter (eller plantesegmenter) afhænger af, hvor mange planter der skal bruges. Der kan f.eks. overføres fem skudsegmenter i en Fernbach-kolbe, og tre skudsegmenter i en Erlenmeyer-kolbe, hver med en længde på 5 cm. Kasser alle rødder samt blomstrende, døde eller andre iøjnefaldende dele.

⁽¹⁾ Carl von Linné (* 23. maj 1707 i Råshult /Älmhult; † 10. januar 1778 i Uppsala).

Figur 1

Beskæring af planter til stam- og prækultur efter tre ugers dyrkning.

Dyrkning af planter skal udføres i 500-ml-Erlenmeyer- og 2 000-ml-Fernbach-kolber i en køleinkubator ved 20 ± 2 °C med konstant lys på ca. $100\text{--}150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ eller 6 000-9 000 lux (udsendt af belysning med farvetemperaturen »varmt hvidt lys«).

Figur 2

Dyrkning af planter i en køleinkubator med kammerbelysning.

Der bør anvendes kemisk rene (syrevaskede) og sterile dyrkningsbeholdere af glas samt aseptisk håndtering. I tilfælde af kontaminering af stamkulturen med f.eks. alger, svampe og/eller bakterier bør der fremstilles en ny kultur eller anvendes en stamkultur fra et andet laboratorium til fornyelse af denne kultur.

Tillæg 4

VEDLIGEHOVELSE AF PRÆKULTUR OG FREMSTILLING AF TESTORGANISME TIL TEST

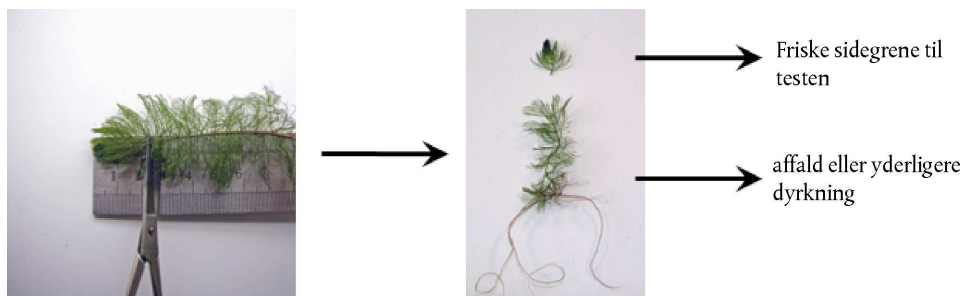
For at fremstille en prækultur skæres skud af stamkulturen i segmenter med to grenkranse hver. Segmenterne lægges i Fernbach-kolber fyldt med modificeret Andrews-medium (tilsat 3 % saccharose). Hver kolbe kan indeholde op til 50 skudsegmenter. Det skal imidlertid sikres, at segmenterne er vitale og ikke har nogen rødder, sidegrene eller knopper (jf. fig. 1 i tillæg 3).

Prækulturens organismer dyrkes i 14 til 21 dage under sterile forhold i et konditioneringsrum med vekslende lyse og mørke perioder i intervaller af 16/8 timer. Lysintensiteten vælges i området $100\text{--}150\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$. Temperaturen i testbeholderne bør være $23 \pm 2\ ^\circ\text{C}$.

Da det modificerede Andrews-medium indeholder saccharose (som stimulerer væksten af alger, svampe og bakterier), bør testkemikalieopløsningen fremstilles og dyrkes under sterile forhold. Alle væsker samt udstyr steriliseres inden brug. Sterilisering sker via behandling med opvarmet luft ($210\ ^\circ\text{C}$) i fire timer eller autoklavering i 20 minutter ved $121\ ^\circ\text{C}$. Desuden skal alle flasker, fade, skåle mv. og andet udstyr underkastes flammebehandling ved en steril arbejdsbænk umiddelbart før brug.

Skud fjernes axenisk fra prækulturkanterne, idet der vælges så homogent et materiale som muligt. Hver test kræver mindst 60 testorganismer (test med otte testkemikaliekoncentrationer). Til testen anvendes friske sidegrene fra prækulturer, der afkortes til 2,5 cm fra roden (målt med lineal) og overføres til et bægerglas med sterilt modificeret Andrews-medium. Disse friske sidegrene kan anvendes til sedimentfri toksicitetstest af *Myriophyllum spicatum*.

Figur 2

Opskæring af planter fra prækulturen til den sedimentfri toksicitetstest af *Myriophyllum spicatum*.

C.51 Toksicitetstest af vandsedimentet *Myriophyllum spicatum*

INDLEDNING

1. Denne forsøgsmetode svarer til OECD-testvejledning (Test Guideline) 239 (2014). Der findes forsøgsmetoder for den flydende, enkimbladede vandplante af arten *Lemna* (1) og for algearter (2). Disse metoder anvendes rutinemæssigt til at generere data til at vurdere risikoen ved testkemikalier, især kemikalier med herbicid aktivitet, for vandplantearter, der ikke er målarter. I nogle tilfælde kan der imidlertid være behov for oplysninger om yderligere makrofyter. Den seneste vejledning offentliggjort af workshopen i Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) om risikovurdering af akvatiske makrofyter for pesticider (Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides (AMRAP)) viste, at der kan være behov for data om makrofyter med rod for testkemikalier, hvor *Lemna* og alger er kendt for ikke at være følsomme over for virkningsmekanismen, eller hvis separation til sediment er et problem, der fører til eksponering via rodoptagelse (3). Baseret på vores nuværende viden og erfaring blev *Myriophyllum* spp valgt som den foretrukne art i de tilfælde, hvor der er behov for data om en tokimbladet undervandsart med rod (4) (5) (6). Denne test erstatter ikke andre akvatiske toksicitetstest, men bør derimod supplere dem, så der kan foretages en mere fuldstændig fare- og risikovurdering af vandplanter. Forsøgsmetoden for vandsedimenter *Myriophyllum spicatum* supplerer den sedimentfri toksicitetstest for *Myriophyllum spicatum* (7).
2. Dette dokument beskriver en forsøgsmetode, som giver mulighed for at vurdere virkningerne af et testkemikalie på vandplantearten *Myriophyllum spicatum*, som har rødder, og som vokser i et vandsedimentsystem. Forsøgsmetoden er til dels baseret på eksisterende metoder (1) (2) (8) og tager højde for den seneste forskning i forbindelse med risikovurderingen af vandplanter (3). Vandsedimentmetoden er blevet valideret af en international ringtest med *Myriophyllum*-arter, der er blevet dyrket under statiske forhold, og som blev eksponeret for testkemikalie, der blev tilført via vandsøjlen (9). Testsystemet kan dog nemt tilpasses, så det giver mulighed for eksponering via spiket sediment eller eksponering via vandfasen i semistatiske scenarier eller scenarier med pulserende dosis, selv om disse scenarier ikke har undergået en formel ringtest. Endvidere kan den generelle metode anvendes til andre vandarter og fremspirende arter med rod, herunder andre arter af *Myriophyllum* (f.eks. *Myriophyllum aquaticum*) og *Glyceria maxima* (10). Det kan være nødvendigt at foretage ændringer i testbetingelser, design og varighed for alternative arter. Der er navnlig behov for ekstraarbejde i forbindelse med fastlæggelse af hensigtsmæssige procedurer for *Myriophyllum aquaticum*. Disse muligheder er ikke belyst i denne forsøgsmetode, som beskriver standardmetoden til eksponering af *Myriophyllum spicatum* i et statisk system via vandfasen.
3. Denne forsøgsmetode gælder for stoffer, som forsøgsmetoden er valideret for (se nærmere oplysninger i ringtestrapporten (9)), eller formuleringer eller kendte blandinger. Der kan foretages en *Myriophyllum*-test for at opfylde kravet om tier-1-data udløst af eventuel separation af testkemikalie til sediment eller spørgsmål om virkningsmekanisme/selektivitet. Ligeledes kan der være behov for en laboratoriebaseret *Myriophyllum*-test som led i en højere tier-strategi, der skal imødekomme bekymringer om risikoen for vandplanter. Den specifikke grund til at foretage en test bestemmer eksponeringsvejen (dvs. via vand eller sediment). Før forsøgsmetoden anvendes til en lovmæssig test af en blanding, bør det overvejes, om den vil give resultater, som er egnede til formålet, og i givet fald hvorfor. Sådanne overvejelser er ikke nødvendige, når der foreligger et myndighedskrav om test af blandingen.

PRINCIP FOR TESTEN

4. Testen er udviklet til at vurdere kemiske virkninger på den vegetative vækst af *Myriophyllum*-planter, der dyrkes i standardiserede medier (vand, sediment og næringsstoffer). Af denne grund dyrkes topskud af sunde, ikke-blomstrende planter i standardiseret, kunstigt sediment, som tilsættes yderligere næringsstoffer for at sikre, at planten vokser tilstrækkeligt, og derefter vedligeholdes de i Smart and Barko-medium (tillæg 1). Efter en etableringsperiode, hvor roden dannes, eksponeres planterne for en række testkoncentrationer, der tilsættes vandsøjlen. Alternativt kan eksponering via sediment simuleres ved at spike det kunstige sediment med testkemikalie og transplantere planterne til dette spikede sediment. I begge tilfælde vedligeholdes planterne derefter i et kontrolleret miljø i 14 dage. Virkningen på væksten bestemmes ud fra kvantitative vurderinger af skuddenes længde, friskvægt og tørvægt samt kvalitative observationer af symptomer såsom chlorose, nekrose eller vækstdeformiteter.

5. De kemikalierelaterede virkninger kvantificeres ved, at væksten i testopløsningerne sammenholdes med væksten i kontrolplanterne, hvorudfra man bestemmer den koncentration, som frembringer en bestemt hæmning på x % af væksthastigheden, og som betegnes EC_x ; " x " kan være en vilkårlig værdi afhængigt af lovkravene, f.eks. EC_{10} , EC_{20} og EC_{50} . Det bør bemærkes, at estimater af EC_{10} - og EC_{20} -værdier kun er pålidelige og relevante i test, hvor variationskoefficienterne i kontrolplanterne falder til under det anslåede effektniveau, dvs. variationskoefficienterne bør være < 20 % for at give et robust skøn af EC_{20} .
6. Både den gennemsnitlige specifikke væksthastighed (anslået ud fra vurderinger af længden af skuddene, skuddenes friskvægt og tørvægt) og udbytte (anslået ud fra den øgede længde af skuddene, skuddenes friskvægt og skuddenes tørvægt) af ubehandlede og behandlede planter bør bestemmes. Den specifikke væksthastighed (r) og udbyttet (y) anvendes efterfølgende til at bestemme henholdsvis $E_r C_x$ (f.eks. $E_r C_{10}$, $E_r C_{20}$, $E_r C_{50}$) og $E_y C_x$ (f.eks. $E_y C_{10}$, $E_y C_{20}$, $E_y C_{50}$).
7. Om nødvendigt kan den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) og nuleffektkoncentrationen (NOEC) bestemmes statistisk ud fra vurderinger af den gennemsnitlige specifikke væksthastighed og udbyttet.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

8. Der bør foreligge en tilstrækkeligt følsom analysemetode til kvantitativ bestemmelse af kemikaliets i testmediet.
9. Af oplysninger om testkemikaliets, der kan være nyttige ved fastsættelse af testbetingelserne, kan nævnes strukturformel, sammensætning i tilfælde af stoffer med flere bestanddele, UVCB'er, blandinger eller formuleringer, renhed, vandopløselighed, stabilitet i vand, lysstabilitet, syrestyrkekonstant (pK_a) fordelingskoefficient octanol/vand (K_{ow}), hvis der findes K_d for sediment, damptryk og bionedbrydelighed. Vandopløseligheden og damptrykket kan bruges til at beregne Henrys konstant, som angiver, om der kan forventes væsentligt tab af testkemikalie i løbet af testperioden. Hvis der sandsynligvis kan forventes tab af kemikalier, bør tabene kvantificeres, og de efterfølgende trin til at kontrollere sådanne tab bør dokumenteres. Er oplysningerne om testkemikaliets opløselighed og stabilitet usikre, anbefales det at vurdere disse egenskaber under testbetingelserne, dvs. med samme næringsmedium, temperatur og belysning som i testen. *Bemærk:* Ved test af lysafhængige peroxiderende herbicider bør laboratorielyst indeholde den forekomst af ultraviolet lys, som findes i naturligt sollys.
10. pH-værdien bør måles og justeres i testmediet, hvor det er relevant. Kontrollen af testmediets pH-værdi er særlig vigtig, f.eks. ved test af metaller eller kemikalier, som er hydrolytisk ustabile. I OECD's vejledning (11) findes der yderligere vejledning i test af kemikalier, hvis fysisk-kemiske egenskaber vanskeliggør testen (11).

TESTENS GYLDIGHED

11. For at testresultaterne er gyldige, skal den gennemsnitlige samlede længde af skuddene og den gennemsnitlige samlede friskvægt af skuddene hos kontrolplanterne som minimum fordobles i testens eksponeringsfase. Desuden må kontrolplanterne ikke vise synlige symptomer på chlorose og bør være synligt fri for forurening fra andre organismer såsom alger og/eller bakteriel film på planterne, på overfladen af sedimentet og i testmediet.
12. Den gennemsnitlige variationskoefficient for udbytte baseret på målinger af vægten af friske skud (dvs. fra testen påbegyndes, til den afsluttes) i kontrolkulturterne må ikke overstige 35 % mellem replikaterne.

REFERENCEKEMIKALIE

13. Et referencekemikalie, f.eks. 3,5-dichlorphenol, der anvendes i ringtesten (9), bør testes løbende for at kontrollere testprocedurens resultater over tid. Data fra ringtesten viser, at de gennemsnitlige EC_{50} -værdier for 3,5-DCP for de forskellige responsvariable lå på mellem 4,7 og 6,1 mg/l (se ringtestrapporten for nærmere detaljer om det forventede konfidensinterval omkring disse værdier). Det tilrådes, at test af et referencekemikalie finder sted mindst to gange årligt eller, hvis testfrekvensen er ujævn, sideløbende med den endelige toksicitetstest. Der findes en vejledning til forventede EC_{50} -værdier for 3,5-DCP i den statistiske rapport om internationale ringtest (9).

BESKRIVELSE AF METODEN

Testapparatur

14. Testen bør udføres under kontrollerede forhold, dvs. i et vækstkammer, vækstrum eller laboratorium, med kontrollerbar dagslængde, belysning og temperatur (jf. afsnittet "Testbetingelser", punkt 56-58). Stamkulturer bør holdes adskilt fra testbeholdere.
15. Undersøgelsen bør udføres ved hjælp af testbeholdere af glas, f.eks. akvarier eller bægerglas; der anvendes almindeligvis 2-liters bægerglas (ca. 24 cm høje og 11 cm i diameter). Andre (dvs. større) beholdere kan være egnede under forudsætning af, at der er tilstrækkelig vanddybde til ubegrænset vækst og til at holde planterne nedsænket i hele testperioden.
16. Plast- eller glaskrucker (ca. 9 cm i diameter og 8 cm høje og rumfang på 500 ml) kan anvendes som beholdere til udplantning af planterne i sedimentet. Alternativt kan der anvendes bægerglas, og disse foretrakkes i nogle tilfælde (f.eks. til test af hydrofobe kemikalier eller kemikalier med høj K_{ow}).
17. Størrelsen af krukken/bægerglasset skal tages i betragtning sammen med valget af testbeholder og det foretrukne testdesign (jf. nedenfor). Hvis testdesign A anvendes (et skud pr. krukke med tre krukke pr. beholder), kan det være nødvendigt at anvende mindre krukke eller større beholdere. Hvis testdesign B anvendes (tre skud pr. krukke og en krukke pr. beholder), bør den anførte størrelse krukke og beholder være tilstrækkelig. Under alle omstændigheder bør der være en vanddybde på mindst 12 overskydende cm over sedimentets overflade, og forholdet mellem sedimentets overfladeareal/rumfang og vandoverfladeareal/rumfang bør registreres.

Testorganisme

18. Den generelle tilgang beskrevet i denne forsøgsmetode kan anvendes til at teste en række vandplantearter. De betingelser, som er beskrevet i denne forsøgsmetode, er imidlertid tilpasset test af arter af tusindbladsfamilien, *Myriophyllum spicatum*. Denne art tilhører den tokimbladede familie, Haloragaceae.
19. *Myriophyllum spicatum* (eurasisk tusindblad) er en undervandsart med rødder, som tåler en lang række forhold og findes i både statisk og strømmende vand. *M. spicatum* er en flerårig plante, der dør tilbage til rødderne i vintermånederne. Planterne blomstrer normalt frit og sætter frø frit, selv om vegetativ formering fra skud eller stammefragmenter, der løsriver sig naturligt eller efter forstyrrelser, ofte er den primære koloniseringsmetode.

Dyrkning af testorganismen

20. Planter kan fås fra naturlige populationer eller via leverandører af vandplanter. I begge tilfælde bør kilden til planterne dokumenteres, og arternes identitet bør kontrolleres. Der bør udvises stor forsigtighed for at sikre, at der indsamles de korrekte arter af *Myriophyllum spicatum* i felten, især i områder, hvor den kan hybridiseres med andre *Myriophyllum*-arter. I tvivlstilfælde anbefales det at anvende verificerede laboratoriekulturer fra kendte kilder. Planter, der har været eksponeret for kemiske forurenende stoffer eller er indsamlet fra lokaliteter, der vides at være kontaminerede, bør ikke benyttes i denne test.
21. I regioner, hvor *M. spicatum* ikke umiddelbart er tilgængelig i vintermånederne, kan det være nødvendigt at vedligeholde stamkulturer på lang sigt i et drivhus eller under laboratorieforhold. Stamkulturer bør vedligeholdes under samme forhold som testbetingelser, selv om bestråling og temperatur kan nedsættes med henblik på at reducere hyppigheden af kulturvedligeholdelse (f.eks. når der ikke er planlagt test af *Myriophyllum* i en periode). Det anbefales at bruge større akvarier og plantekrucker, end der ville blive brugt i test, for at give plads til spredning. Sammensætningen af sediment og vandmedier bør være den samme som i test, selv om der kan anvendes alternative metoder til sedimentgødning (f.eks. brug af kommercielle gødningsformuleringer med langsom frigivelse).

22. Stamplanter bør være synligt fri for forurening med andre organismer, herunder snegle, trådalger, svampe og insekter, f.eks. æg eller larver af *Paraponyx stratiotata*-møl og larver eller voksne snudebiller, curculionidae, af arten *Eubrychius velutus*. Det kan være nødvendigt at skylle plantemateriale i ferskvand for at fjerne synlig forurening. Desuden bør der gøres en indsats for at minimere udviklingen af kontaminering med encellede alger og bakterier, om end det ikke er nødvendigt med fuldstændig sterilt plantemateriale. Stamkulturerne bør overvåges og om nødvendigt transplanteres for at undgå kontaminering med alger og bakterier. Stamkulturer kan med fordel beluftes, såfremt kontaminering med alger eller bakterier bliver et problem.
23. I alle tilfælde dyrkes/akklimatiseres planter under forhold, der ligner, men ikke nødvendigvis er identiske med de forhold, der anvendes i testen i en passende periode (dvs. > 2 uger), før de anvendes i en test.
24. Blomstrende stamkulturer bør ikke anvendes i en test, da den vegetative vækst generelt falder under og efter blomstring.

Sediment

25. Det anbefales at bruge følgende formulerede sediment, som er baseret på det syntetiske sediment, der anvendes i kapitel C.28 i dette bilag (8), i denne test. Sedimentet fremstilles som beskrevet i TM C.28, idet der dog tilsættes nedenstående næringsstoffer:
- a) 4-5 % tørv (tørvægt, i henhold til $2 \pm 0,5$ % organisk kulstof) så tæt på pH 5,5 til 6,0 som muligt. Det er vigtigt at bruge tørv i form af pulver, fint formålet (helst partikelstørrelse på < 1 mm) og kun lufttørret.
 - b) 20 % (tørvægt) kaolinholdigt ler, helst med over 30 % kaolinit.
 - c) 75-76 % (tørvægt) kvartssand (overvejende finsand med over 50 % af en partikelstørrelse på 50 til 200 μm).
 - d) Et vandigt næringsmedie tilsættes således, at det endelige sedimentparti indeholder 200 mg/kg tørt sediment af både ammoniumchlorid og natriumphosphat, og vandindholdet i den færdige blanding ligger på 30-50 %.
 - e) Kemisk rent calciumcarbonat (CaCO_3) tilsættes for at få en pH-værdi i den færdige sedimentblanding på $7,0 \pm 0,5$.
26. Oprindelsen af tørv, kaolinler og sand bør være kendt og dokumenteret. Hvis oprindelsen er ukendt eller giver anledning til bekymring, bør det kontrolleres, at sedimentkomponenterne ikke indeholder kemisk forurening (f.eks. tungmetaller, organiske chlorforbindelser, organiske phosphorforbindelser osv.).
27. De tørre bestanddele i sedimentet skal blandes homogent, inden den vandige næringsopløsning blandes grundigt i sedimentet. Det fugtige sediment skal fremstilles mindst to dage før brug, så tørven kan gennemvædes, og for at forhindre, at hydrofobe tørvepartikler flyder op til overfladen, når sedimentet dækkes med medie. Inden brug kan det fugtige sediment opbevares i mørke.
28. Ved testen overføres sedimentet til beholdere af en passende størrelse såsom plantekrukker med en diameter, som passer ind i glasbeholderne (sedimentets overflade skal dække ca. 70 % eller mere af beholderens overflade). Såfremt beholderen har huller i bunden, vil et stykke filterpapir i bunden af beholderen hjælpe med at holde sedimentet i beholderen. Krukkerne fyldes med sedimentet således, at sedimentets overflade er jævn, inden det dækkes med et tyndt lag (~ 2 til 3 mm) af et inert materiale som f.eks. sand eller fint havegrus (eller knust koral) for at holde sedimentet på plads.

Testmedium

29. Smart and Barko-medium (12) anbefales til dyrkning og test af *Myriophyllum spicatum*. Dette medie fremstilles som beskrevet i tillæg 1. Mediets pH-værdi (vandfase) ved testens påbegyndelse skal være mellem 7,5 og 8,0 for optimal plantevækst.

Testdesign

30. Testen bør omfatte mindst seks replikate testbeholdere til den ubehandlede kontrolgruppe og mindst fire replikate testbeholdere for hver af mindst fem koncentrationer.
31. Hvis der ikke kræves bestemmelse af NOEC, kan testens design ændres, så der er flere forskellige koncentrationer og færre replikater for hver koncentration.
32. Hver testbeholder svarer til et replikat med tre skud. Der er to muligheder for at dyrke tre skud i hver testbeholder:
 - Testdesign A: et skud pr. krukke og tre krukker pr. beholder.
 - Testdesign B: tre skud pr. krukke og en krukke pr. beholder.
 - Alternative testdesign af et skud pr. krukke pr. testbeholder kan accepteres, forudsat at replikationen justeres som krævet for at opnå de krævede validitetskriterier.
33. De enkelte testbeholdere randomiseres til behandlingsgrupperne. Testbeholdernes placering i testområdet skal være randomiseret for at minimere indflydelsen af rumlige forskelle i lysintensitet eller temperatur.

Koncentrationer af testkemikalie og kontrolgrupper

34. Koncentrationer bør normalt følge en kvotientrække med en foretrukken kvotient mellem testkoncentrationerne på højst 3,2. Det vil lette valget af passende testkemikaliekoncentrationer, hvis man på forhånd kender til testkemikaliet toksicitet fra en test til bestemmelse af dosisinterval.
35. Ved bestemmelse af en EC_x -værdi skal denne ligge i det område, testkoncentrationerne dækker, for at den skal blive bestemt med et tilstrækkeligt konfidensniveau. Ved beregning af en EC_{50} -værdi bør den højeste testkoncentration således være større end EC_{50} -værdien. Ligger EC_{50} -værdien uden for testkoncentrationernes område, bliver de tilhørende konfidensintervaller store, så det kan blive umuligt at foretage en pålidelig vurdering af modellens statistiske fit. Brug af flere testkoncentrationer vil forbedre konfidensintervallet omkring den resulterende EC_x -værdi.
36. For at bestemme LOEC/NOEC (valgfrit endepunkt) skal den laveste testkoncentration være tilstrækkeligt lav til, at væksten ikke er væsentligt forskellig fra væksten i kontrolplanterne. Desuden skal den højeste testkoncentration være så høj, at væksten er væsentligt mindre end i kontrolprøven. Brug af flere replikater vil øge den statistiske power af nuleffektkoncentrationen/ANOVA-designet.

Grænsetest

37. I de tilfælde, hvor en indledende test viser, at testkemikallet er uden bivirkninger i koncentrationer på op til 100 mg/l, dog ikke over kemikaliet opløselighed i testmediet eller i tilfælde af en formulering op til grænsen af dens dispergeringsevne, kan der udføres en grænsetest for at gøre det lettere at sammenholde responsen i en kontrolgruppe med responsen i en behandlingsgruppe (100 mg/l eller en koncentration lig med opløselighedsgrænsen eller 1000 mg/kg tørt sediment). Denne test bør følge de generelle principper for en standardtest med fast dosis med den undtagelse, at det tilrådes at øge det mindste antal replikater til seks testbeholdere pr. kontrol og koncentration. Væksten i kontrol- og behandlingsgruppen kan analyseres med en statistisk test til sammenligning af middelværdier, f.eks. Students t-test.

Testopløsninger

38. Testopløsninger fremstilles sædvanligvis ved fortynding af en stamopløsning fremstillet ved opløsning eller dispergering af testkemikallet i Smart and Barko-medium ved hjælp af demineraliseret (dvs. destilleret eller deioniseret) vand (jf. tillæg 1).

39. Den højeste testkoncentration bør normalt ikke overstige testkemikaliets vandopløselighed eller, i tilfælde af formuleringer, dispergerbarheden under testbetingelserne.
40. For testkemikalier med lav vandopløselighed kan det være nødvendigt at fremstille en koncentreret stamopløsning eller -dispersion af kemikaliets ved hjælp af et organisk opløsnings- eller dispergeringsmiddel for at lette tilsætning af nøjagtige mængder testkemikalie til testmediet og medvirke til, at det dispergeres eller opløses. Brug af sådanne opløsnings- eller dispergeringsmidler bør så vidt muligt søges undgået. Brug af sådanne hjælpeopløsnings- og dispergeringsmidler bør ikke medføre fytotoksisk virkning. Som eksempler på almindeligt anvendte opløsningsmidler, der er uden fytotoksisk virkning i koncentrationer på op til 100 µl/l, kan nævnes acetone og dimethylformamid. Hvis der anvendes et opløsnings- eller dispergeringsmiddel, bør dets slutkoncentration rapporteres og holdes på et minimum ($\leq 100 \mu\text{l/l}$). Under disse omstændigheder bør alle behandlinger og (opløsningsmiddel)kontroller indeholde den samme koncentration af opløsningsmiddel eller dispergeringsmiddel. Ubehandlede kontrolreplikater, som ikke indeholder et opløsnings- eller dispergeringsmiddel, indarbejdes også i testdesignet. Nærmere anvisninger vedrørende brug af dispergeringsmidler kan findes i OECD vejledning (11).

TESTPROCEDURE

41. Forsøgsmetoden varierer i forhold til anvendelsen af testkemikaliets (dvs. via vand eller sediment). Testkemikaliets sandsynlige adfærd i et vandsedimentsystem bør overvejes for at kunne vælge den anvendte eksponering i testen (dvs. statisk eller statisk fornyelse, spiket vand eller spiket sediment). Spiket sediment kan i nogle tilfælde være at foretrække for kemikalier, der vil give en væsentlig fordeling til sediment.

Etableringsfase

42. Sunde skudspidser, dvs. uden sideskud, skæres af kulturplanterne for at få en skudlængde på 6 cm (± 1 cm). For testdesign A (et skud pr. krukke og tre krukke pr. beholder) plantes enkelte skudspidser i hver krukke. For testdesign B (tre skud pr. krukke og en krukke pr. beholder) plantes fire til fem skudspidser i hver krukke med sediment.
43. I begge tilfælde bør overskydende krukke tilplantes for at give mulighed for at udvælge ensartede planter ved testens start og for at have ekstra planter til rådighed, som kan anvendes til at undersøge rodvæksten umiddelbart før behandling og til overskydende planter, der høstes til skudbiomasse og længdemålinger på dag 0.
44. Skud isættes således, at ca. tre cm, der dækker mindst to knuder, er under sedimentets overflade.
45. Krukkerne overføres derefter til testbeholdere under samme miljømæssige betingelser, som gælder for eksponeringsfasen, og vedligeholdes i syv dage i Smart and Barko-medium for at fremkalde rodudvikling.
46. Herefter bør flere planter i overskydende krukke fjernes med henblik på undersøgelse af rodvæksten. Hvis rodvæksten ikke er synlig (dvs. rodspidsen ikke er synlig), bør etableringsfasen forlænges, indtil rodvæksten er synlig. Dette trin anbefales for at sikre, at planterne vokser aktivt, når testen indledes.

Udvælgelse af ensartet plantemateriale

47. For testdesign A (et skud pr. krukke og tre krukke pr. beholder) udvælges ensartede krukke, inden testen indledes. For testdesign B (tre skud pr. krukke og en krukke pr. beholder) fjernes overskydende planter, så der er tre planter tilbage af ensartet størrelse og udseende.

Eksponering via vandfasen

48. Krukker, der er udvalgt for deres ensartethed, anbringes i testbeholderne som krævet med henblik på test. Smart and Barko-medium tilsættes derefter testbeholderne. Der bør udvises omhu for at undgå forstyrrelse af sedimentet. Med henblik herpå kan der tilføjes medium ved hjælp af en tragt eller en plasticskive for at dække sedimentet, mens mediet hældes i testbeholderne, forudsat at skiven fjernes umiddelbart efter. Alternativt kan plantekrukkerne placeres i testbeholderne efter tilsætning af mediet. I begge tilfælde kan der anvendes friske medier ved begyndelsen af eksponeringen, hvis det er nødvendigt for at minimere den potentielle udvikling af alger og bakterier, eller for at give mulighed for at fremstille enkelte partier testopløsning på tværs af replikater.
49. Skuddenes længde over sedimentet måles enten før eller efter tilsætning af mediet.
50. Den relevante mængde af testkemikaliat kan tilsættes testmediet, inden det tilsættes testbeholderne. Alternativt kan testkemikaliat tilsættes mediet, efter det er blevet tilsat testbeholderne. I dette tilfælde bør det sikres, at testkemikaliat fordeles homogent i hele testsystemet uden at forstyrre sedimentet.
51. I alle tilfælde registreres testmediets udseende (f.eks. klart, grumset mv.) ved starten af testen.

Eksponering via sediment

52. Spiket sediment af den valgte koncentration fremstilles ved, at en opløsning af testkemikaliat tilsættes det friske sediment direkte. En stamopløsning af testkemikaliat opløst i deioniseret vand blandes med det formulerede sediment ved brug af valsning, en foderblander eller manuel blanding. Hvis testkemikaliat er tungtopløseligt i vand, kan det opløses i den mindst mulige mængde af et passende organisk opløsningsmiddel (f.eks. hexan, acetone eller chloroform). Denne opløsning blandes derefter med ca. 10 g fint kvartssand til et testglas. Opløsningsmidlet lades afdampe, hvorefter sandet blandes med den passende mængde sediment pr. testglas. Kun midler, der let fordamper, kan bruges til at opløse, dispergere eller emulgere testkemikaliat. Mængden/vægten af det sand, der spikes med testkemikaliat, bør tages i betragtning, når sedimentet fremstilles (dvs. sediment bør således fremstilles med mindre sand). Det bør sikres, at det testkemikalie, der tilsættes sedimentet, fordeles grundigt og jævnt i sedimentet.
53. Det spikede sediment fyldes i krukkerne (som beskrevet ovenfor). Planter, der er udvalgt for ensartethed og et passende rodsystem, fjernes fra de krukker, som blev anvendt i etableringsfasen, og overføres til det spikede sediment som beskrevet ovenfor.
54. Krukkerne anbringes i testbeholderne som krævet med henblik på test. Smart and Barko-medium tilsættes derefter forsigtigt (dvs. ved hjælp af en tragt) for at undgå at forstyrre sedimentet. Skuddenes længde over sedimentet måles enten før eller efter tilsætning af mediet.

Vedligeholdelse af vandstand gennem hele testperioden

55. Det endelige vandvolumen skal registreres, og vandstanden markeres på hver enkelt testbeholder. Hvis vandet fordamper under testen med mere end 10 %, bør vandstanden justeres med destilleret vand. Om nødvendigt kan bægerglas tildækkes løst med et gennemsigtigt låg, f.eks. af plast, for at mindske fordampning og kontaminering med algesporer.

Testbetingelser

56. Lysstofrør med varmt og/eller køligt hvidt lys anvendes til at give lys med en strålingsintensitet på omkring $140 (\pm 20) \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ målt som en fotosyntetisk aktiv stråling (400-700 nm) i vandoverfladen med et forhold mellem lys og mørke på 16:8 timer. Lysets strålingsintensitet over testområdet bør ikke afvige mere end ± 15 % fra den valgte strålingsintensitet.

57. Temperaturen i testbeholderne er 20 ± 2 °C.
58. Kontrolmediets pH-værdi bør højst stige med 1,5 enheder under testen. Dog vil en afvigelse på mere end 1,5 enhed ikke gøre testen ugyldig, når det kan vises, at de tidligere angivne validitetskriterier er opfyldt.

Testens varighed

59. Eksponeringsperioden er 14 dage.

Målinger og analytiske bestemmelser

60. Efter etableringsfasen og umiddelbart før behandling (dvs. på dag 0) høstes overskydende planter fra fem vilkårligt udvalgte krukker til designet med tre planter pr. krukke eller 15 krukker til designet med en plante pr. krukke, med henblik på vurdering af skuddenes længde samt frisk- og tørvægt som beskrevet nedenfor.
61. For planter overført til eksponeringsfasen foretages følgende vurderinger som vist i tabel 1:
- Vurderinger af hovedskuddenes længde, antal sideskud og længden af sideskud registreres som minimum ved afslutningen af eksponeringsperioden (f.eks. på dag 14).
 - Visuelle vurderinger af plantesundheden registreres mindst tre gange i løbet af eksponeringsperioden (f.eks. på dag 0, 7 og 14).
 - Vurderinger af skuddenes frisk- og tørvægt foretages ved testens afslutning (dvs. på dag 14).
62. Skuddenes længde bestemmes ved hjælp af en lineal. Antal og længde af eventuelle sideskud bør også måles.
63. Visuelle vurderinger af plantesundheden foretages ved at registrere planternes udseende og testmediets generelle tilstand. Observationer, der skal bemærkes, omfatter:
- Nekrose, chlorose eller anden misfarvning som f.eks. overdreven rødmen i forhold til kontrolplanterne.
 - Udvikling af kontaminering med bakterier eller alger.
 - Vækstabiliteter som f.eks. nedsat vækst, ændret internodal længde, forvanskede skud/blade, spredning af sideskud, bladtab, tab af turgor og stammefragmentering.
 - Der foretages en visuel vurdering af rodens sundhed ved testens afslutning ved omhyggelig at vaske sediment af rødderne, så rodsystemet kan observeres. Den foreslåede skala for vurdering i forhold til kontrolplanterne er vist nedenfor:
- 1) manglende rødder
 - 2) få rødder
 - 3) moderat rodudvikling
 - 4) meget god rodudvikling svarende til kontrolplanterne
64. Vurderinger af friskvægt foretages ved testens begyndelse og afslutning ved at skære skuddet ved sedimentet og derefter duppe det tørt inden vejningen. Det er vigtigt at fjerne sedimentpartikler, der sidder fast i bunden af skuddet. Skudmateriale anbringes derefter i et tørreskab ved ca. 60 °C og tørres til en konstant vægt, inden det vejes på ny, og tørvægten registreres.
65. Et resumé af de biologiske risikovurderinger, der som minimum kræves i testperioden, er anført i tabel 1.

Tabel 1

Behandlingsplan

Dag efter be-handling (DAT)	<i>Myriophyllum spicatum</i>			
	Skudlængde, længde og antal af sideskud	Visuel bedømmelse af skud	Skuds frisk- og tørvægt Visuel bedømmelse af rødder	pH O ₂
0	A	A	A	A
4	—	—	—	—
7	—	A	—	A
14	A	A	A	A

A: angiver, at en vurdering er påkrævet i disse tilfælde

—: angiver, at målinger ikke er påkrævet

Hyppighed af målinger og analytiske bestemmelser

66. Mindst en gang dagligt bør temperaturen af substratet i en surrogatbeholder, der opbevares ved samme betingelser i klimakammeret, inkubatoren eller lokalet (eller kontinuerligt med en datalogger), måles.
67. pH-værdien og koncentrationen af opløst ilt i testmediet bør kontrolleres ved testens start, mindst en gang i løbet af undersøgelsen og ved afslutningen af undersøgelsen i alle replikate beholdere. I hvert enkelt tilfælde bør der foretages målinger på samme tidspunkt på dagen. Hvis der anvendes bulkopløsninger til at fremstille alle replikater for hver testkoncentration, er en enkelt måling af hver bulkopløsning tilstrækkelig på dag 0.
68. Strålingsintensiteten bør måles i vækstkammeret, inkubatoren eller lokalet på punkter svarende til vandoverfladeniveau. Målingerne bør foretages mindst en gang ved testens start eller i løbet af testen. Den anvendte metode til lysdetektion og -måling, specielt den anvendte type sensor, vil påvirke måleværdien. Sfæriske sensorer (som reagerer på lys fra alle vinkler over og under måleplanet) og cosinus-sensorer (som reagerer på lys fra alle vinkler over måleplanet) må foretrækkes frem for retningsbestemte sensorer og vil give højere aflæsninger fra en lyskilde bestående af mange punkter som den her beskrevne.

Analytiske målinger af testkemikaliet

69. Den korrekte anvendelse af testkemikaliet bør understøttes af analytiske målinger af koncentration af testkemikaliet.
70. Der bør indsamles vandprøver til kemisk testanalyse kort efter starten af testen (dvs. på dagen for anvendelse af stabile testkemikalier eller en time efter anvendelsen af kemikalier, som ikke er stabile) og ved testens afslutning for samtlige testkoncentrationers vedkommende.
71. Koncentrationer i sediment og sedimentets porevand bør bestemmes ved starten og afslutningen af testen, som minimum i den højeste testkoncentration, medmindre testkemikalierne er kendt for at være stabile i vand (> 80 % af den nominelle værdi). Målinger i sediment og porevand er muligvis ikke nødvendige, hvis fordelingen af testkemikaliet mellem vand og sediment er blevet tydeligt bestemt i et vand- og sedimentforsøg under lignende betingelser (f.eks. forhold mellem vand og sediment, anvendelsesmetode og sedimenttype).

72. Udtagning af prøver af sediment ved testens start kan medføre forstyrrelser i testsystemet. Der kan derfor være behov for yderligere testbeholdere for at gøre det lettere at foretage analytiske bestemmelser ved testens begyndelse og afslutning. Tilsvarende gælder det, at hvis det skønnes, at der er behov for foreløbige vurderinger, dvs. på dag 7, og analyser kræver store prøver af sediment, som er svære at fjerne fra testsystemet, bør der foretages analyser ved hjælp af yderligere testbeholdere, der er behandlet på samme måde som dem, der anvendes til biologiske vurderinger.
73. Centrifugering ved f.eks. 10 000 g og 4 °C i 30 minutter anbefales for at isolere interstitielt vand. Hvis det påvises, at testkemikaliets ikke absorberer til filtre, kan filtrering dog accepteres. I nogle tilfælde er det ikke muligt at analysere koncentrationer i porevandet, hvis prøvestørrelsen er for lille.
74. I semistatiske test (dvs. eksponering via vandfasen), hvor koncentrationen af det eller de relevante testkemikalier ikke ventes at holde sig inden for 20 % af den nominelle koncentration gennem hele testperioden uden udskiftning af testopløsninger, bør der udtages prøver af brugte og frisk fremstillede testopløsninger til analyse af koncentrationen af testkemikaliets ved hver udskiftning.
75. I de tilfælde, hvor den målte startkoncentration af testkemikaliets ikke ligger inden for 20 % af den nominelle værdi, men hvor der kan fremlægges tilstrækkelig dokumentation for, at startkoncentrationerne er repeterbare og stabile (dvs. inden for området 80-120 % af startkoncentrationen), kan det godtages, at der kun foretages kemisk bestemmelse af den højeste og laveste testkoncentration.
76. I alle tilfælde behøver man kun at bestemme testkemikaliets koncentration i et af måleglassene i en flergangsbestemmelse for hver af testkoncentrationerne. Alternativt kan testopløsninger af alle replikater for hver koncentration samles med henblik på analyse.
77. Hvis det kan konstateres, at koncentrationen af testkemikaliets har været holdt inden for 20 % af den nominelle eller målte startkoncentration under hele testen, kan analysen af resultaterne og den efterfølgende udledning af endepunkter baseres på nominelle eller målte startværdier.
78. I disse tilfælde bør effektkoncentrationer baseres på de nominelle eller målte vandkoncentrationer ved testens start.
79. Hvis der imidlertid er beviser for, at koncentrationen er faldet (dvs. ikke holdes inden for 20 % af den nominelle eller målte startkoncentration i det behandlede kammer) under hele testen, bør analysen af resultaterne baseres på den geometriske middelfkoncentration under eksponeringen eller modeller, der beskriver faldet i koncentrationen af testkemikaliets i det behandlede kammer (11).

DATAVURDERING

80. I de tilfælde, hvor det er nødvendigt at anvende et opløsningsmiddel/dispergeringsmiddel, kan data fra opløsningsmiddelkontrol og ubehandlede kontroller samles med henblik på statistiske analyser, forudsat at responserne fra opløsningsmiddelkontrollen og den ubehandlet kontrol ikke er statistisk signifikant forskellige.

Responsvariable

81. Formålet med testen er at bestemme testkemikaliets virkning på testartens vegetative vækst ved hjælp af to responsvariable, nemlig den gennemsnitlige specifikke væksthastighed og udbyttet, som følger:

Gennemsnitlig specifik væksthastighed

82. Denne responsvariabel er baseret på ændringer i logaritmerne for den samlede længde af skuddene, den samlede friskvægt af skuddene og den samlede tørvægt af skuddene over tid i kontrollerne og i hver behandlingsgruppe. Denne variabel beregnes for hver replikat af hver kontrol- og behandlingsgruppe. Den gennemsnitlige længde og vægt af de tre planter pr. testbeholder (replikat) og efterfølgende væksthastigheden for hver replikat, bør beregnes ved hjælp af følgende formel:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

hvor:

μ_{i-j} : er den gennemsnitlige specifikke væksthastighed i tidsrummet fra i til j

N_i : er værdien af målevariablen i test- eller kontrolbeholderen til tiden i

N_j : er værdien af målevariablen i test- eller kontrolbeholderen til tiden j

t: er tidsrummet fra i til j

83. Ud fra responsværdierne for de enkelte replikater bør der beregnes en gennemsnitlig væksthastighed samt estimer for variansen for hver behandlings- og kontrolgruppe.
84. Den gennemsnitlige specifikke væksthastighed bør beregnes for hele testperioden (tiden "i" i ovenstående formel er testens starttid, og tiden "j" er testens sluttid). For hver testkoncentration og kontrol beregnes en gennemsnitsværdi af den specifikke væksthastighed samt estimer for variansen.
85. Hæmningen i procent af væksthastigheden (I_r) kan derefter beregnes for hver testkoncentration (behandlingsgruppe) ved hjælp af følgende formel:

$$\%I_r = \frac{(\mu_c - \mu_r)}{\mu_c} \times 100$$

hvor:

$\% I_r$: er procent hæmning af den gennemsnitlige specifikke væksthastighed

μ_c : er gennemsnitsværdien af μ i kontrolgruppen

μ_r : er gennemsnitsværdien af μ i behandlingsgruppen

Udbytte

86. Denne responsvariabel er baseret på ændringer i den samlede længde af skuddene, den samlede friskvægt af skuddene og den samlede tørvægt af skuddene over tid i kontrollerne og i hver behandlingsgruppe. Udbyttehæmningen i procent ($\% I_y$) kan beregnes for hver behandlingsgruppe som følger:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_r)}{b_c}$$

hvor:

$\% I_y$: er udbyttereduktionen i procent

b_c : er slutbiomasse minus startbiomasse for kontrolgruppen

b_r : er slutbiomasse minus startbiomasse for behandlingsgruppen

Optegning af koncentration/respons-kurver

87. Der bør afsættes koncentration/respons-kurver over sammenhængen mellem den gennemsnitlige hæmningsprocent for responsvariablene (I_t eller I_y , beregnet som vist ovenfor) og logaritmen for testkemikaliekoncentrationen.

Beregning af EC_x

88. Estimerne for EC_x (f.eks. EC_{50}) bør baseres på gennemsnitsværdien dels af specifik væksthastighed (E_rC_x), dels af udbytte (E_yC_x), der hver især bør baseres på den samlede friskvægt af skuddene, den samlede tørvægt af skuddene og den samlede længde af skuddene).
89. Det bør bemærkes, at EC_x -værdier beregnet ved hjælp af disse to responsvariable ikke er sammenlignelige, og denne forskel haves for øje ved anvendelse af testens resultater. EC_x -værdier baseret på gennemsnitlig specifik væksthastighed (E_rC_x) vil i de fleste tilfælde være højere end resultater baseret på udbytte (E_yC_x), når testbetingelserne i denne forsøgsmetode er overholdt, hvilket følger af det matematiske grundlag for de to beregningsmåder. Denne forskel bør ikke opfattes som en forskel i følsomhed mellem de to responsvariable, men kun, at der er tale om to matematisk forskellige størrelser.

Statistiske metoder

90. Målet er at formulere en kvantitativ koncentrations/respons-sammenhæng ved hjælp af regressionsanalyse. Der kan anvendes vægtet lineær regression efter forudgående lineariserende transformation af responsdataene, til f. eks. probit-, logit- eller Weibull-enheder (13), men det må foretrækkes at benytte ikke-lineære regressionsmetoder, da de bedre håndterer de uundgåelige uregelmæssigheder i data og afvigelser fra jævne fordelinger. I området tæt på enten ingen hæmning eller total hæmning kan sådanne uregelmæssigheder blive forstørret ved transformation og derved gribe forstyrrende ind i analysen (13). Det må bemærkes, at standardanalysemetoder, hvor der bruges probit-, logit- eller Weibull-transformerede variable, er bestemt til brug på binære data (f.eks. død eller overlevelse) og bør modificeres for at kunne benyttes til data for væksthastighed eller udbytte. Særlige metoder til bestemmelse af EC_x -værdier ud fra kontinuerte data findes i henvisning (14) (15) (16) og (17).
91. For hver responsvariabel, der skal analyseres, anvendes koncentrations/respons-forholdet til at beregne punktestimer for EC_x -værdier. Konfidensgrænsen på 95 % for hvert estimat bestemmes, og responsdataenes grad af egnethed til regressionsmodellen bør vurderes enten grafisk eller statistisk. Regressionsanalysen bør foretages ud fra responsværdierne for de enkelte replikater, ikke gruppegennemsnit.
92. Hvis de tilgængelige regressionsmodeller eller -metoder er uegnede til dataene, kan estimer og konfidensgrænser for EC_{50} desuden fås ved lineær interpolation med bootstrapping (18).
93. Til beregning af et estimat for LOEC og dermed NOEC må middelværdierne for behandlingerne sammenholdes ved hjælp af variansanalyse. Gennemsnittet for hver koncentration sammenholdes derefter med gennemsnittet for kontrollerne ved hjælp af en egnet forsøgsmetode (f.eks. Dunnetts eller Williams test) (19) (20) (21) (22). Det skal vurderes, om variansanalysens forudsætning om normal fordeling (ND) og varianshomogenitet (VH) er opfyldt. Denne vurdering bør foretages i en Shapiro-Wilks-test (ND) eller Levenes test (VH). Manglende opfyldelse af forudsætningen om ND og varianshomogenitet kan undertiden afhjælpes ved logaritmisk transformation af dataene. Hvis variansheterogenitet og/eller afvigelse fra ND er ekstrem og ikke kan korrigeres ved transformation, bør det overvejes at analysere ved hjælp af metoder som Bonferroni-Welch-t-test, step-down Jonkheere Terpstra test og Bonferroni-Median-test. Supplerende vejledning for bestemmelse af NOEC er givet i (16).

RAPPORTERING

94. Testrapporten indeholder følgende oplysninger:

Testkemikalie

Stof med kun en bestanddel:

— fysisk udseende, vandopløselighed og yderligere relevante fysisk-kemiske egenskaber

- kemisk identifikation, f.eks. IUPAC-navn eller CAS-navn, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kode, strukturformel, renhed, kemisk identitet af urenheder, i det omfang det er relevant og praktisk muligt, osv.

Stof med flere bestanddele, UVCB-stoffer og blandinger:

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

Testarter

- videnskabeligt navn og kilde

Testbetingelser

- varighed af og betingelser for etableringsfasen
- den anvendte forsøgsmetode (statisk, semistatisk, pulseret)
- startdato og varighed for testen
- testmedium, dvs. sediment og flydende næringsmedium
- beskrivelse af testens design: vækstkammer/rum eller laboratorium, testbeholdere og låg, opløsningsvolumener, længde og vægt af testplanter pr. testbeholder ved testens start, forholdet mellem sedimentets overflade og vandoverflade, forholdet mellem sediment og vandvolumen
- testkoncentrationer (nominelle eller målte) og antal replikater for hver koncentration
- metoder til fremstilling af stam- og testopløsninger, herunder eventuelle opløsnings- og dispergeringsmidler
- testtemperaturen
- lyskilde, strålingsintensitet ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)
- pH-værdierne for test- og kontrolmedier samt testmediets udseende ved testens start og afslutning
- oxygenkoncentrationer
- analysemetoder med fyldestgørende oplysninger om kvalitetsvurdering (valideringsundersøgelser, standardafvigelser eller konfidensgrænser for analyserne)
- metoder til bestemmelse af målevariable, f.eks. længde, tørvægt, friskvægt
- alle fravigelser fra denne forsøgsmetode.

Resultater

- rådata: skuddenes længde og skuddenes vægt for planter/krukker og andre målevariable i hver test- og kontrolbeholder ved hver observation og hver analyse i henhold til vurderingsplanen i tabel 1
- gennemsnit og standardafvigelser for hver målevariabel
- vækstkurver for hver koncentration
- fordoblingstid/væksthastighed i kontrollen på grundlag af skuddenes længde og friskvægt, herunder variationskoefficienten for udbyttet af friskvægt
- beregnede responsvariable for hver behandlingsreplikant, med gennemsnitsværdier og variationskoefficient for replikaterne
- grafisk fremstilling af sammenhængen mellem koncentration og virkning
- estimater for toksicitetsendepunkter for responsvariable, f.eks. EC_{50} , med tilhørende konfidensintervaller. LOEC og/eller NOEC (hvis disse er beregnet) og de statistiske metoder, der er anvendt til at beregne dem

- hvis variansanalyse er anvendt, størrelsen af den virkning, det er muligt at påvise (f.eks. mindste signifikante forskel)
- enhver vækststimulation, der er fundet ved nogen behandling
- ethvert visuelt tegn på fytotoksicitet samt observationer af testopløsningerne
- diskussion af resultaterne, herunder den eventuelle betydning af fravigelser fra denne forsøgsmetode for resultaterne

LITTERATUR

- 1) Kapitel C.26 i dette bilag: Lemna sp. Væksthæmningstest.
- 2) Kapitel C.3 i dette bilag: Ferskvandsalger og cyanobakterier, væksthæmningstest.
- 3) Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 januar 2008.
- 4) Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, Vol. 153, pp. 199-206.
- 5) ISO 16191:2013 Water quality — Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of Myriophyllum aquaticum.
- 6) Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, Vol. 62/8, pp. 715-722.
- 7) Kapitel C.50 i dette bilag: Toksicitetstest af sedimentfri myriophyllum spicatum
- 8) Kapitel C.28 i dette bilag: Toksicitetstest af sediment/vand på chironomider med spiket vand
- 9) Ratte, M., H. Ratte (2014), "Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using M. aquaticum and M. spicatum grown in a water-sediment system", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 206, OECD Publishing, Paris.
- 10) Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron — a case study, Pest Management Science, Vol. 59/2, pp. 231 — 237.
- 11) OECD (2000), "Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.
- 12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, Vol. 21/3, pp. 251-263.
- 13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, Vol. 18/9, pp. 713-718.
- 14) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/2, pp. 157-167.
- 15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/10, 1485-1494.
- 16) OECD (2006), "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.
- 17) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, Vol. 29/2, pp/ 93-96.

- 18) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
 - 19) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of the American Statistical Association, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.
 - 20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, Vol. 20/3, pp. 482-491.
 - 21) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics, Vol. 27/1, pp. 103-117.
 - 22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, Vol. 28/2, pp. 519-531.
-

Tillæg 1

SAMMENSETNING AF SMART AND BARKO-MEDIUM

Komponent	Mængde reagens tilsat vand (*) (mg/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	91,7
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	69,0
NaHCO_3	58,4
KHCO_3	15,4
pH (luftligevægt)	7,9

(*) demineraliseret (dvs. destilleret eller deioniseret) vand

Tillæg 2

DEFINITIONER

Biomasse: frisk- og/eller tørvægten af det levende materiale, som er til stede i en population. I denne test er biomasse summen af hovedskud, alle sidegrene og alle rødder.

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Chlorose: farveændringen fra grøn til gul i testorganismen, især i grenkranse.

Ec_x: den koncentration af testkemikaliet, som er opløst i testmediet, der resulterer i en reduktion på x % (f. eks. 50 %) i væksten i *Myriophyllum spicatum* inden for en fastlagt eksponeringstid (som udtrykkeligt skal angives, hvis den adskiller sig fra den fulde eller normale testperiode). For klart at skelne mellem EC-værdier afledt af henholdsvis væksthastighed og udbytte anvendes betegnelsen »E_rC« for væksthastighed (rate) og »E_yC« for udbytte (yield), efterfulgt af den anvendte målevariabel, f.eks. E_rC (længde af hovedskud).

Vækst: stigning i målevariablen, f.eks. længde af hovedskud, samlet længde af sidegrene, samlet længde af skud, samlet længde af rødder, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse i testperioden.

Væksthastighed: (gennemsnitlig specifik væksthastighed): den logaritmiske forøgelse i målevariablen i eksponeringsperioden. *Bemærk:* Væksthastighedsrelaterede responsvariable er uafhængige af testens varighed, så længe vækstmønsteret for ueksponerede organismer er eksponentiel.

Laveste koncentration med observeret effekt (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC): den laveste testede koncentration, ved hvilken kemikaliet har vist statistisk signifikant ($p < 0,05$) vækstnedsættende virkning i forhold til kontrollerne inden for en given eksponeringsperiode. Imidlertid skal alle undersøgte koncentrationer, der ligger over LOEC, have haft en skadelig virkning, som er større end eller lig med den, som er observeret ved LOEC. Er disse to betingelser ikke opfyldt, bør der fyldestgørende redegøres for, hvordan den pågældende LOEC (og dermed NOEC) er valgt.

Målevariable: enhver type variabel, der måles for at udtrykke endepunktet for en test ved hjælp af en eller flere forskellige responsvariable. Målevariable i denne forsøgsmetode er længden af hovedskud, samlet længde af sidegrene, samlet længde af skud, samlet længde af rødder, friskvægt, tørvægt og antal grenkranse.

Monokultur: en kultur med en planteart.

Nekrose: dødt (dvs. hvidt eller mørkebrunt) væv fra testorganismen.

Koncentration uden statistisk sikkert observeret effekt (NOEC): testkoncentrationen lige under LOEC.

Responsvariabel: en variabel, som anvendes til vurdering af den toksiske virkning og er afledt af vilkårlige målevariable, der beskriver biomassen ved andre beregningsmetoder. I nærværende forsøgsmetode er væksthastighed og udbytte responsvariable, der er afledt af målevariable som længde af hovedskud, samlet længde af skud, friskvægt, tørvægt eller antal grenkranse.

Semistatisk test (udskiftningstest): en test, hvor testopløsningen udskiftes med bestemte intervaller i løbet af testen.

Statisk test: en forsøgsmetode, hvor testopløsningen ikke udskiftes under testen.

Testkemikalie: er stoffer eller blandinger, der testes med denne forsøgsmetode.

Endepunkt for en test: den generelle faktor, som testkemikaliet fremkalder en ændring af i forhold til kontrollen som mål for testen. I denne forsøgsmetode er endepunktet væksthæmning, som kan udtrykkes ved forskellige responsvariable, der er baseret på en eller flere målevariable.

Testmedium: det komplette, syntetiske næringsmedium, hvorpå testplanterne vokser, når de eksponeres for testkemikaliet. Normalt er testkemikaliet opløst i testmediet.

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

Udbytte: værdien af en målev variabel for biomasse ved eksponeringsperiodens slutning minus værdien af samme variabel ved eksponeringsperiodens start. Bemærk: Når vækstmønsteret for ueksponerede organismer er eksponentiel, falder udbyttebaserede responsvariable med testperioden.
