

II

(Icke-lagstiftningsakter)

FÖRORDNINGAR

KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EU) 2017/735

av den 14 februari 2017

om ändring, för anpassning till den tekniska utvecklingen, av förordning (EG) nr 440/2008 om testmetoder enligt Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach)

(Text av betydelse för EES)

EUROPEISKA KOMMISSIONEN HAR ANTAGIT DENNA FÖRORDNING

med beaktande av fördraget om Europeiska unionens funktionssätt,

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

av följande skäl:

- (1) I kommissionens förordning (EG) nr 440/2008 ⁽²⁾ fastställs testmetoder som ska användas för tillämpning av förordning (EG) nr 1907/2006 när det gäller bestämning av kemikaliers fysikalisk-kemiska egenskaper, toxicitet och ekotoxicitet.
- (2) Det är nödvändigt att uppdatera förordning (EG) nr 440/2008 för att införa nya och uppdaterade testmetoder som nyligen har antagits av Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), i syfte att ta hänsyn till tekniska framsteg och säkerställa en minskning av antalet djur som används för försök, i enlighet med Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU ⁽³⁾. Samråd har förts med berörda parter om detta utkast.
- (3) Anpassningen till tekniska framsteg omfattar tjugo testmetoder: en ny metod för bestämning av en fysikalisk-kemisk egenskap, fem nya testmetoder och en uppdaterad testmetod för bedömning av ekotoxicitet, två uppdaterade testmetoder för bedömning av omvandling, spridning och fördelning i miljön samt fyra nya och sju uppdaterade testmetoder för bestämning av effekter på människors hälsa.
- (4) OECD ser regelbundet över sina testriktlinjer för att identifiera dem som är vetenskapligt föråldrade. Genom denna anpassning till tekniska framsteg utgår sex testmetoder för vilka de motsvarande testriktlinjerna från OECD har annullerats.

⁽¹⁾ EUT L 396, 30.12.2006, s. 1.

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

⁽³⁾ Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål (EUT L 276, 20.10.2010, s. 33).

- (5) Förordning (EG) nr 440/2008 bör därför ändras i enlighet med detta.
- (6) De åtgärder som föreskrivs i denna förordning är förenliga med yttrandet från den kommitté som inrättats i enlighet med artikel 133 i förordning (EG) nr 1907/2006.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

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

Artikel 2

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

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

Utfärdad i Bryssel den 14 februari 2017.

På kommissionens vägnar
Jean-Claude JUNCKER
Ordförande

BILAGA

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

(1) I del A ska följande kapitel läggas till:

"A.25 DISSOCIATIONSKONSTANTER I VATTEN (TITRERINGSMETOD – SPEKTROFOTOMETRISK METOD – KONDUKTOMETRISK METOD)

INLEDNING

Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje 112 (1981).

Förutsättningar

- Lämplig analysmetod
- Vattenlöslighet

Vägledande information

- Strukturformel
- Elektrisk ledningsförmåga för konduktometrisk metod

Kvalificerande angivelser

- Alla testmetoder kan utföras på rena eller kommersiellt producerade ämnen. Eventuella effekter av föroreningar på resultaten bör övervägas.
- Titreringsmetoden är inte lämplig för ämnen med låg löslighet (se testlösningar nedan).
- Den spektrofotometriska metoden är endast tillämplig på ämnen som har ett märkbart annorlunda UV/VIS-absorptionsspektrum för dissocierade och icke-dissocierade former. Denna metod kan även vara lämplig för ämnen med låg löslighet och för icke-syra/basdissociationer, t.ex. komplexbildning.
- I de fall där Onsager-ekvationen håller kan den konduktometriska metoden användas, även vid måttligt låga koncentrationer och även i händelse av icke-syra/basjämvikter.

Standarddokument

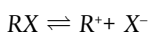
Denna testmetod är baserad på de metoder som anges i avsnittet "Litteratur" och på dokumentet *Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification EPA* av den 18 augusti 1978.

METOD – INLEDNING, SYFTE, OMFATTNING, RELEVANS, TILLÄMPNING OCH TESTGRÄNSER

Ämnets dissociation i vatten är av betydelse för bedömningen av dess miljöpåverkan. Detta styr ämnets form, vilket i sin tur avgör hur det beter sig och överförs. Det kan påverka kemikaliens adsorption till jord och sediment och absorption in i biologiska celler.

Definitioner och enheter

Dissociation är en reversibel uppdelning i två eller flera kemiska ämnen som kan vara joniska. Processen anges vanligen genom



och koncentrationens jämviktskonstant som styr reaktionen är

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

I det särskilda fallet där R är väte (ämnet är en syra) är konstanten t.ex.

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

eller

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

Referensämnen

Följande referensämnen behöver inte användas i samtliga fall när ett nytt ämne ska undersökas. Referensämnen tillhandahålls främst för att emellanåt kalibrera metoden och möjliggöra en jämförelse av resultaten när en annan metod tillämpas.

	pK _a ⁽¹⁾	Temp. i °C
p-nitrofenol	7,15	251
Bensoesyra	4,12	20
p-kloranilin	3,93	20

⁽¹⁾ Inget värde för 20 °C är tillgängligt, men det kan antas att mätresultatets variationer är högre än det förväntade temperaturberoendet.

Här är det användbart att ha ett ämne med flera pK enligt avsnittet Testmetodens princip nedan. Exempel på sådana ämnen:

Citronsyra	pK _a ⁽⁸⁾	Temp. i °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Testmetodens princip

Den kemiska process som beskrivs är i allmänhet endast något temperaturberoende i det miljömässigt relevanta temperaturintervallet. Bestämningen av dissociationskonstanten kräver en mätning av koncentrationerna av det kemiska ämnets dissocierade och icke-dissocierade former. Med utgångspunkt från kunskapen om dissociationsreaktionens stökiometri enligt avsnittet Definitioner och enheter ovan kan den lämpliga konstanten bestämmas. I det särskilda fall som beskrivs i denna testmetod betar sig ämnet som en syra eller en bas, och bestämningen görs lämpligen genom att fastställa de relativa koncentrationerna av ämnets joniserade och icke-joniserade former och lösningens pH-värde. Förhållandet mellan dessa termer anges i ekvationen för pK_a i avsnittet Definitioner och enheter ovan. Vissa ämnen uppvisar mer än en dissociationskonstant och liknande ekvationer kan utvecklas. Några av de metoder som beskrivs här är också lämpliga för icke-syra/bas-dissociation.

Kvalitetskriterier

Repetierbarhet

Dissociationskonstanten bör replikeras (minst tre bestämningar) till inom ± 0,1 log-enheter.

BESKRIVNING AV TESTFÖRFARANDENA

Det finns två grundläggande metoder för bestämning av pK_a . Den ena metoden omfattar titrering av en känd mängd av ämnet med standardsyra eller standardbas i förekommande fall, och enligt den andra metoden bestäms den relativa koncentrationen av de joniserade och icke-joniserade formerna och deras pH-beroende.

Förberedelser

Metoder som baseras på dessa principer kan klassificeras som titreringsförfaranden samt spektrofotometriska och konduktometriska förfaranden.

Testlösningar

För titreringsmetoden och den konduktometriska metoden ska det kemiska ämnet lösas upp i destillerat vatten. För den spektrofotometriska metoden och andra metoder används buffertlösningar. Koncentrationen av testämnet bör inte överstiga det mindre av 0,01 M eller halva mättnadskoncentrationen, och den renaste tillgängliga formen av ämnet bör användas för att bereda lösningarna. Om ämnet endast är måttligt lösligt kan det lösas i en liten mängd lösningsmedel som är blandbart i vatten innan de koncentrationer som anges ovan tillsätts.

Lösningarna bör kontrolleras med avseende på förekomst av emulsioner med hjälp av Tyndallstrålen, särskilt om ett hjälplösningsmedel har använts för att förbättra lösligheten. När buffertlösningar används bör bufferhalten inte överstiga 0,05 M.

Testbetingelser*Temperatur*

Temperaturen bör regleras till minst ± 1 °C. Bestämningen bör företrädesvis utföras vid 20 °C.

Vid misstanke om betydande temperaturberoende bör bestämningen utföras åtminstone vid två andra temperaturer. I detta fall bör temperaturintervallen vara 10 °C och temperaturkontrollen $\pm 0,1$ °C.

Analyser

Vilken metod som används beror på det testade ämnets natur. Metoden måste vara tillräckligt känslig för att möjliggöra bestämning av de olika kemiska beståndsdelarna vid varje testlösningskoncentration.

Testförfarande*Titreringsmetod*

Testlösningen bestäms genom titrering med standardbas- eller standardsyralösning i förekommande fall, med mätning av pH-värdet efter varje tillsats av titreringsmedel. Minst tio stegvisa tillsatser bör göras före ekvivalenspunkten. Om jämvikt nås tillräckligt snabbt kan en registreringspotentiometer användas. För denna metod måste både den totala mängden av ämnet och dess koncentration vara exakt kända. Försiktighetsåtgärder måste vidtas för att utesluta koldioxid. Uppgifter om förfarande, försiktighetsåtgärder och beräkning ges i standard-testerna, t.ex. litteraturhänvisningarna (1), (2), (3), (4).

Spektrofotometrisk metod

En våglängd söks fram där de joniserade och icke-joniserade formerna av ämnet har avsevärt olika extinktionskoefficienter. UV-/VIS-absorptionsspektrumet erhålls från lösningar med konstant koncentration under ett pH-tillstånd där ämnet är i huvudsak icke-joniserat och helt joniserat och vid flera mellanliggande pH-värden. Detta kan antingen göras genom tillsats av omgångar av koncentrerad syra (bas) till en relativt stor mängd av en lösning av ämnet i en multikomponentbuffert, till en början vid högt (lågt) pH (litteraturhänvisning 5), eller genom tillsats av lika stora volymer av en stamlösning av ämnet i t.ex. vatten eller metanol, till konstanta volymer av olika buffertlösningar som täcker det önskade pH-intervallet. Från pH- och absorbansvärdena vid den valda våglängden beräknas ett tillräckligt antal värden för pK_a med hjälp av data från minst 5 pH där ämnet är joniserat till minst 10 procent och högst 90 procent. Ytterligare uppgifter om försöket och beräkningsmetoden anges i litteraturhänvisning (1).

Konduktometrisk metod

Med användning av en cell med en liten och känd cellkonstant mäts ledningsförmågan hos en ca 0,1 M lösning av ämnet i konduktivitetlösning. Ledningsförmågan hos ett antal noggrant gjorda utspädningar av lösningen mäts också. Koncentrationen halveras varje gång och serien bör omfatta minst en storleksordning i koncentrationen. Den begränsande ledningsförmågan vid oändlig utspädning fastställs genom att ett liknande försök görs med Na-saltet och extrapolering. Dissociationsgraden kan sedan beräknas utifrån varje lösningens ledningsförmåga med hjälp av Onsager-ekvationen. Dissociationskonstanten kan beräknas med hjälp av Ostwalds utspädningslag, som $K = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$ där C är koncentrationen i mol per liter och α är den dissocierade fraktionen. Försiktighetsåtgärder måste vidtas för att utesluta koldioxid. Ytterligare uppgifter om försöket och beräkningsmetoden anges i standardtexter samt i litteraturhänvisningarna (1), (6) och (7).

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

Titreringsmetod

pK_a beräknas för 10 uppmätta punkter på titreringskurvan. Medelvärde och standardavvikelsen för sådana pK_a -värden beräknas. Ett diagram med pH avsatt mot volymerna av standardbas eller standardsyra bör ingå tillsammans med en presentation i tabellform.

Spektrofotometriska metoder

Absorbans och pH från varje spektrum ställs upp i tabellform. Minst fem värden för pK_a beräknas från de mellanliggande datapunkterna i spektrumet. Även medelvärde och standardavvikelse för dessa resultat beräknas.

Konduktometrisk metod

Motsvarande ledningsförmåga Λ beräknas för varje syrakoncentration och för varje koncentration av en blandning av en syraekvivalent och en 0,98 ekvivalent av karbonatfri natriumhydroxid. Syftet med överskottssyran är att förhindra överskott av OH^- på grund av hydrolys. $1/\Lambda$ avsätts mot $\sqrt{C}$ och Λ_0 av saltet bestäms genom extrapolering till nollkoncentration.

Λ_0 av syran kan beräknas med användning av litteraturvärden för H^+ och Na^+ . PK_a kan beräknas från $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_0$ och $K_a = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$ för varje koncentration. Bättre värden för K_a kan fås genom korrigeringar för rörlighet och aktivitet. Medelvärde och standardavvikelser för PK_a -värden bör beräknas.

Testrapport

Alla rådata och beräknade PK_a -värden bör lämnas in tillsammans med beräkningsmetoden (företrädesvis i tabellformat, såsom föreslås i litteraturhänvisning 1), och detsamma gäller de statistiska parametrar som beskrivs ovan. För titreringsmetoder bör uppgifter om standardiseringen av titreringsmedel anges.

För den spektrofotometriska metoden bör samtliga spektrum anges. För den konduktometriska metoden bör uppgifter om bestämningen av cellkonstant rapporteras. Uppgifter om använd teknik samt analysmetoder och typen av eventuella buffertar bör också lämnas.

Testtemperaturer ska rapporteras.

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, s. 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, (mars 1973).
 - (6) ASTM D 1125 – Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.
 - (7) Standard Method 205 – APHA/AWWA/NPCF (se ovan (4)).
 - (8) *Handbook of Chemistry and Physics*, 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980)."
- (2) I del B ska kapitel B.5 ersättas med följande:

"B.5 AKUT ÖGONIRRITATION/ÖGONKORROSION

INLEDNING

Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 405 (2012). OECD:s riktlinjer för kemikaliestetning ses över med jämna mellanrum för att säkerställa att de återspeglar bästa tillgängliga vetenskap. Vid tidigare revideringar av denna testriktlinje lades särskilt stor vikt vid möjligheterna till bättre testningsförfaranden, där djurskyddsfrågor beaktas så väl som möjligt. Sådana förfaranden innebär att all existerande information om testkemikalien utvärderas i syfte att undvika onödiga djurförsök. TG 405 (antagen 1981 och uppdaterad 1987, 2002 och 2012) innehåller en rekommendation om att laboratoriet, innan det beskrivna in vivo-testet för akut ögonkorrosion/ögonirritation inleds, bör göra en weight-of-the-evidence-analys (1) av existerande relevanta data. Om de data som finns att tillgå inte är tillräckliga bör behövliga data genereras med hjälp av stegvis testning (2) (3). Den rekommenderade testningsstrategin inbegriper validerade och godkända in vitro-test och anges i ett tillägg till denna testmetod. För tillämpningen av förordning (EG) nr 1907/2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach) ⁽¹⁾, ingår även en integrerad teststrategi i Echas relevanta vägledning (21). Testning på djur bör endast utföras om det bedöms vara nödvändigt efter övervägande av tillgängliga alternativa metoder och efter användning av de metoder som bedömts vara lämpliga. Vid tidpunkten för utarbetandet av denna uppdaterade testmetod var användningen av testmetoden fortfarande nödvändig i vissa fall eller krävdes enligt vissa regelverk.

Den senaste uppdateringen inriktas främst på användningen av smärtstillande medel och bedövningsmedel och påverkar inte testriktlinjens grundläggande princip och struktur. ICCVAM ⁽²⁾ och en oberoende internationell vetenskaplig expertpanel har granskat användbarhet och begränsningar när det gäller rutinmässig användning av lokalbedövningsmedel, systemiska smärtstillande medel och humana endpoints för säkerhetstester i fråga om ögonirritation (12). Granskningen visade att nästan all eller hela smärtan och lidandet kan undvikas med hjälp av lokalbedövningsmedel och systemiska smärtstillande medel utan att testet påverkas och ledde till rekommendationen att dessa ämnen alltid ska användas. Granskningen har beaktats i denna testmetod. Lokalbedövningsmedel, systemiska smärtstillande medel och humana endpoints bör användas rutinmässigt vid in vivo-testning med avseende på ögonirritation/ögonkorrosion. Undantag från användning bör motiveras. De förbättringar som beskrivs i denna metod kommer att bidra till att avsevärt minska eller undvika smärta och lidande hos djuren i de flesta testningssituationer där in vivo-testning fortfarande är nödvändig för att avgöra om ett ämne är säkert för ögonen.

Balanserande förebyggande smärtlindring bör omfatta i) rutinmässig förbehandling med lokalbedövningsmedel (t.ex. proparakain eller tetrakain) och ett systemiskt smärtstillande medel (t.ex. buprenorfin), ii) ett rutinmässigt efterbehandlingsschema med systemiska smärtstillande medel (t.ex. buprenorfin och meloxicam), iii) schemalagd observation, övervakning och registrering av djuren för kliniska tecken på smärta och/eller lidande och iv) schemalagd observation, övervakning och registrering av arten, svårighetsgraden och utvecklingen av alla ögonskador. Närmare uppgifter ges i de uppdaterade förfaranden som beskrivs nedan. När testkemikalien har applicerats bör inga ytterligare lokalbedövningsmedel eller smärtstillande medel användas för att undvika störningar i undersökningen. Smärtstillande medel med antiinflammatorisk verkan (t.ex. meloxicam) bör inte appliceras lokalt och doser som används systematiskt får inte påverka effekterna på ögonen.

Definitionerna anges i tillägget för testmetoden.

⁽¹⁾ Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 av den 18 december 2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach), inrättande av en europeisk kemikaliemyndighet, ändring av direktiv 1999/45/EG och upphävande av rådets förordning (EEG) nr 793/93 och kommissionens förordning (EG) nr 1488/94 samt rådets direktiv 76/769/EEG och kommissionens direktiv 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG och 2000/21/EG. EUT L 304, 22.11.2007, s. 1.

⁽²⁾ USA:s Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods

INLEDANDE ÖVERVÅGANDEN

Med hänsyn till sund vetenskaplig praxis och djurens välbefinnande bör in vivo-testning inte genomföras förrän alla tillgängliga data som är relevanta för kemikaliens förmåga att framkalla hudkorrosion/hudirritation har utvärderats genom en weight-of-the-evidence-analys. Sådana data utgör belägg från befintliga undersökningar på människor och/eller försöksdjur, belägg för ögonkorrosion/ögonirritation i fråga om ett eller flera strukturellt besläktade ämnen eller blandningar av sådana ämnen, data som visar att ämnet är starkt surt eller alkaliskt (4), (5) samt resultat från validerade och godkända in vitro- eller ex vivo-tester med avseende på hudkorrosion och ögonkorrosion/ögonirritation (6) (13) (14) (15) (16) (17). Sådana undersökningar kan ha gjorts före, eller som ett resultat av, en weight-of-the-evidence-analys.

För vissa ämnen kan en sådan analys visa att det behövs in vivo-testning av kemikaliens förmåga att framkalla ögonkorrosion/ögonirritation. I alla sådana fall bör man, innan ett in vivo-ögon-test övervägs, helst göra ett in vivo- eller in vitro-test för utvärdering av kemikaliens verkningar på huden och utvärdera testet enligt den stegvisa testningsstrategin i testmetod B.4 (7) eller den integrerade testningsstrategi som beskrivs i Echas vägledning (21).

En rekommenderad strategi för stegvis testning, som inbegriper validerade och godkända in vitro- eller ex vivo-test med avseende på ögonkorrosion/ögonirritation finns som tillägg till denna metod, och när det gäller Reach i Echas vägledning (21). En sådan testningsstrategi bör tillämpas innan in vivo-tester utförs. För nya kemikalier rekommenderas ett stegvis testningsförfarande för generering av vetenskapligt sunda data om en kemikalies förmåga att framkalla korrosion/irritation. För befintliga kemikalier med otillräckliga data om korrosion/irritation för hud och ögon kan strategin användas för att fylla upp luckor i tillgängliga data. Om en annan testningsstrategi eller ett annat förfarande används, eller om man beslutar att inte använda ett förfarande med stegvis testning, bör detta motiveras.

PRINCIP FÖR IN VIVO-TEST

Efter förbehandling med ett systemiskt smärtstillande medel och lämplig lokalbedövning appliceras testkemikalien som en engångsdos i försöksdjurets ena öga. Det obehandlade ögat används som referens. Graden av ögonirritation eller ögonkorrosion utvärderas genom klassificering av skadorna på ögats bindhinna (konjunktiva), hornhinnan och iris med specifika intervall. Likaså bör övriga verkningar i ögat och skadliga systemiska verkningar beskrivas för att en fullständig utvärdering av verkningarna ska fås. Testet bör pågå tillräckligt länge för att ge möjlighet att utvärdera om de observerade verkningarna är reversibla eller irreversibla.

Djur som uppvisar ihållande tecken på allvarligt lidande och/eller smärta i något skede av testningen eller skador som överensstämmer med de humana endpoints som beskrivs i denna testmetod (se punkt 26) bör avlivas på ett skonsamt sätt, och detta bör beaktas vid utvärderingen av kemikalien. Kriterier för att fatta beslut om skonsam avlivning av döende eller allvarligt lidande djur finns i ett OECD-vägledningsdokument (8).

FÖRBEREDELSE FÖR IN VIVO-TEST

Val av art

Rekommenderat försöksdjur är albinokanin. Friska, unga vuxna exemplar bör användas. Om andra arter eller stammar används bör detta motiveras.

Förberedelse av djuren

De djur som preliminärt har valts ut för testning bör undersökas med avseende på båda ögonen inom 24 timmar före testets början. Djur som har irriterade ögon, okulära defekter eller existerande skada på hornhinnan bör inte användas.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

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

TESTFÖRFARANDE

Användning av lokalbedövningsmedel och systemiska smärtstillande medel

Följande förfaranden rekommenderas för att undvika eller minimera smärta och lidande i testningsförfaranden för att avgöra om ett ämne är säkert för ögonen. Alternativa förfaranden som har visat sig fungera lika bra för att undvika eller lindra smärta och lidande kan användas.

- Sextio minuter innan testkemikalien appliceras ges buprenorfin 0,01 mg/kg genom subkutan injektion (SI) för som smärtstillande behandling. Buprenorfin och andra liknande opioida smärtstillande medel som ges systematiskt är inte kända för att, och förväntas inte, medföra några ändringar av ögats respons (12).
- Fem minuter före appliceringen av testkemikalien appliceras en eller två droppar av ett lokalt oftalmologiskt bedövningsmedel (t.ex. 0,5 % proparakainhydroklorid eller 0,5 % tetrakainhydroklorid) i varje öga. För att undvika eventuella störningar av undersökningen rekommenderas lokalbedövningsmedel som inte innehåller konserveringsmedel. Det öga som inte behandlas med testkemikalien utan med lokalbedövningsmedel används som referens. Om testkemikalien förväntas orsaka betydande smärta och lidande ska det normalt inte testas in vivo. Vid tvivel eller om testning är nödvändig bör man dock överväga ytterligare applicering av lokalbedövningsmedel i femminutersintervaller innan testkemikalien appliceras. Användarna bör vara medvetna om att flera appliceringar av lokalbedövningsmedel kan orsaka en liten ökning av svårighetsgraden och/eller den tid det tar innan kemiskt framkallade skador blir tydliga.
- Åtta timmar efter appliceringen av testkemikalien ges buprenorfin 0,01 mg/kg SI och meloxicam 0,5 mg/kg SI som kontinuerlig smärtstillande behandling. Även om det inte finns några uppgifter som tyder på att meloxicam har en antiinflammatorisk verkan på ögat när det ges genom subkutan injektion en gång om dagen bör det inte ges förrän minst åtta timmar efter det att testkemikalien har applicerats för att undvika eventuella störningar av undersökningen (12).
- När det har gått åtta timmar efter appliceringen av testkemikalien bör buprenorfin 0,01 mg/kg ges genom subkutan injektion var tolfte timme kombinerat med meloxicam 0,5 mg/kg SI var 24:e timme till dess att ögonskadorna läker och det inte finns kliniska tecken på smärta och lidande. Det finns långtidsverkande beredningar av smärtstillande medel som kan övervägas för att minska doseringen av sådana medel.
- Akut smärtlindring bör ges omedelbart efter appliceringen av testkemikalien om förebyggande smärtlindring och lokalbedövning inte är tillräcklig. Om djuret visar tecken på smärta och lidande under undersökningen bör en "akutdos" av buprenorfin 0,03 mg/kg omedelbart ges genom subkutan injektion och upprepas vid behov så ofta som var åttonde timme i stället för 0,01 mg/kg SI var tolfte timme. Meloxicam 0,5 mg/kg ges då genom subkutan injektion var 24:e timme tillsammans med akutdosen av buprenorfin, men inte förrän minst åtta timmar efter appliceringen av testkemikalien.

Applicering av testkemikalien

Testkemikalien tillförs i ena ögats konjunktivasäck (alla djur). Före tillförseln bör det undre ögonlocket varsamt dras ut en bit ut från ögongloben. Ögonlocken förs därefter samman i cirka en sekund för att förhindra att ämnet kommer ut. Det andra, obehandlade ögat används som referens.

Sköljning

Försöksdjurens ögon bör inte sköljas under minst 24 efter tillförseln av testkemikalien, utom när det gäller fasta ämnen (se punkt 18) eller om det uppstår omedelbara korrosiva eller irriterande verkningar. Efter 24 timmar kan ögonen sköljas, om detta bedöms vara lämpligt.

Användningen av en satellitgrupp för att undersöka inverkan av sköljningen rekommenderas inte, utom om det är vetenskapligt motiverat. Om en satellitgrupp används, ska den bestå av två kaniner. Sköljningsbetingelserna bör dokumenteras omsorgsfullt, t.ex. sköljningstidpunkten, lösningens sammansättning och temperatur samt sköljningstiden, applicerad volym och sköljningsintensitet.

Dosnivå**(1) Testning av vätskor**

Vid testning av vätskor används en dos på 0,1 ml. Pumpsprej bör inte användas för att tillföra kemikalien direkt i ögat. I stället bör vätskan spredas in i en behållare, som används för att tillföra 0,1 ml i ögat.

(2) Testning av fasta ämnen

Vid testning av fasta ämnen, pastor och kemikalier i partikelform, bör den tillförda mängden ha en volym på 0,1 ml eller en medelvikt på högst 100 mg. Testkemikalien bör malas ned till fint stoft. Det fasta materialets volym bör mätas efter en varsam kompaktering, som görs till exempel genom att knacka på mätbehållaren. Om en fast testkemikalie inte har tagits bort ur försöksdjurets öga med hjälp av fysiologiska mekanismer vid den första observationstidpunkten (en timme efter behandlingen), kan ögat sköljas med saltlösning eller destillerat vatten.

(3) Testning av aerosoler

Det rekommenderas att material i form av pumpsprej eller aerosol spredas i en behållare, som sedan används för tillförsel i ögat. Det enda undantaget är kemikalier i aerosoler i tryckbehållare som inte går att samla in på grund av förångning. I sådana fall hålls djurets öga öppet och testkemikalien sprutas in i ögat under cirka en sekund, på cirka 10 cm avstånd direkt framför ögat. Avståndet kan variera beroende på behållarens tryck och innehåll. Det är viktigt att se till att ögat inte skadas av sprejtrycket. I tillämpliga fall kan det vara nödvändigt att utvärdera om sprejstyrkan kan framkalla "mekanisk" skada i ögat.

En uppskattning av dosen från en aerosol kan göras genom en simulering på följande sätt: Ämnet spredas på ett vägningspapper genom en öppning som har storleken av ett kaninöga och som hålls strax framför papperet. Papperets viktökning används som grund för att uppskatta den mängd som har spridats i ögat. För flyktiga kemikalier kan dosen uppskattas genom att väga en mottagningsbehållare före och efter borttagning av testkemikalien.

Preliminärt test (in vivo-test avseende ögonirritation/ögonkorrosion på ett enskilt djur)

Det rekommenderas starkt att in vivo-testet först görs på ett enskilt djur (se tillägget till denna testmetod: Strategi för stegvis testning med avseende på ögonirritation och ögonkorrosion). Observationer bör göra det möjligt att bestämma svårighetsgrad och reversibilitet innan man går vidare till ett bekräftande test på ett andra djur.

Om resultatet av ett sådant test tyder på att kemikalien är korrosiv eller framkallar kraftig irritation i ögat när man använder det beskrivna förfarandet, bör ingen ytterligare testning utföras.

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

Om ingen korrosiv verkan eller kraftig irritation observeras vid det preliminära testet, bör responsen (irriterande eller negativ) bekräftas med hjälp av högst två ytterligare djur. Om en kraftig irritation har observerats vid det preliminära testet rekommenderas bekräftande test som görs stegvis på ett djur i taget, i stället för samtidigt test på båda tilläggsdjuren. Om frätning eller kraftig irritation kan observeras på det tilläggsdjur som först används, bör testningen avbrytas. Om resultaten från testet på det andra djuret är tillräckliga för att fastställa en faroklassificering bör inga fler tester utföras.

Observationsperiod

Observationsperioden bör vara tillräckligt lång för att det till fullo ska gå att utvärdera omfattningen och reversibiliteten hos de observerade verkningarna. Försöket bör dock avslutas omedelbart, oavsett hur länge det pågått, om det berörda djuret uppvisar tecken på svåra smärtor eller lidande (8). För fastställandet av verkningarnas reversibilitet bör djuren i regel observeras i 21 dagar efter tillförsel av testkemikalien. Om reversibilitet kan observeras innan 21 dagar har gått kan försöket omedelbart avslutas.

Kliniska observationer och gradering av ögonreaktionerna

Ögonen bör utvärderas noggrant för att bekräfta förekomst eller frånvaro av ögonskador en timme efter appliceringen av testkemikalien, följt av minst dagliga utvärderingar. Försöksdjuren bör bedömas flera gånger dagligen under de första tre dagarna så att beslut om upphörande av testet fattas i rätt tid. Djuren bör utvärderas rutinmässigt under hela undersökningen när det gäller kliniska tecken på smärta och/eller lidande (t.ex. upprepat kرافsande eller gnuggande i ögat, överdrivna blinkningar, överdriven tårbildning) (9) (10) (11), minst två gånger om dagen med minst sex timmar mellan observationerna, eller oftare om så krävs. Detta är nödvändigt för att i) utvärdera djuren på lämpligt sätt för att upptäcka tecken på smärta och lidande och utifrån detta fatta välgrundade beslut om behovet av att öka dosen av smärtstillande medel, och ii) utvärdera djuren för bevis för etablerade humana endpoints för att fatta välgrundade beslut om human avlivning av djuren och säkerställa att sådana beslut fattas i rätt tid. Fluoresceinfärgning bör användas rutinmässigt och spaltlampa bör användas om det anses lämpligt (t.ex. för att bedöma skadans djup vid förekomst av ulceration av kornea) och som ett hjälpmedel för att upptäcka och mäta ögonskador och utvärdera om de fastställda endpointkriterierna för human avlivning är uppfyllda. Digitala fotografier av observerade skador kan samlas in som referensmaterial och för permanent registrering av ögonskadornas omfattning. Djuren bör inte utsättas för testning längre än det är nödvändigt för att få definitiv information. Djur som uppvisar allvarliga tecken på smärta eller lidande bör omedelbart avlivas på ett skonsamt sätt, och detta bör beaktas vid utvärderingen av kemikalien.

Djur som fått följande ögonskador efter tillförsel av kemikalien bör avlivas på ett humant sätt (skadegraderna beskrivs i tabell 1): perforering eller signifikant ulceration av kornea inklusive stafylom, blod i främre ögonkammaren, korneapacitet av grad 4, ingen ljusreaktion (irisreaktion av grad 2) som varar i 72 timmar, ulceration av konjunktivamembran, nekros i konjunktiva- eller blinkhinna eller bildning av sårskorpa. Skälet till avlivningen är att dessa skador i regel är irreversibla. Vidare rekommenderas att följande ögonskador används som humana endpoints för beslut om att avsluta undersökningen före den planerade observationsperioden på 21 dagar. Följande skador anses tyda på allvarliga irritations- eller korrosionsskador och skador som inte förväntas gå tillbaka helt i slutet av observationsperioden på 21 dagar: mycket djupa skador (t.ex. ulceration av kornea som går djupare än ytlagen av stroma), förstörd limbus > 50 %, vilket visar sig i form av blekning av bindhinnevävnaden) och allvarlig ögoninfektion (varutsöndring). En kombination av vaskulering av hornhinnans yta (dvs. pannus), fluoresceinfärgade områden som inte minskar över tiden enligt dagliga utvärderingar och/eller brist på nybildning av epitel fem dagar efter appliceringen av testkemikalien kan också betraktas som eventuellt användbara kriterier för att motivera det kliniska beslutet att avsluta undersökningen i förtid. Dessa resultat är dock individuellt sett inte tillräckliga för att motivera att undersökningen avslutas i förtid. Om allvarliga okulära effekter identifieras bör en behandlande veterinär eller en kvalificerad laboratorieveterinär som är utbildad i att identifiera kliniska skador konsulteras för en klinisk undersökning i syfte att avgöra om kombinationen av dessa effekter motiverar att undersökningen avslutas i förtid. Graderna av okulär reaktion (konjunktiva, kornea och iris) bör fastställas och registreras 1, 24, 48 och 72 timmar efter appliceringen av kemikalien (tabell 1). Djur som inte utvecklar okulära skador ska inte avlivas förrän det har gått tre dagar från tillförsel av ämnet. Djur med okulära skador som inte är allvarliga bör observeras tills skadorna läks, eller under 21 dagar. Efter det avslutas undersökningen. Observationer bör göras och registreras efter minst 1, 24, 48 och 72 timmar samt efter 7, 14 och 21 dagar i syfte att fastställa skadornas status och huruvida de är reversibla eller inte. Tätare observationer bör göras om det är nödvändigt för att avgöra om försöksdjuren bör avlivas av humana skäl eller avlägsnas från undersökningen på grund av negativa resultat.

Graderna av okulära skador (tabell 1) bör registreras vid varje undersökning av djuren. Likaså bör alla andra ögonskador (t.ex. pannus, missfärgning, förändringar i främre ögonkammaren) eller skadliga systemiska verkningar även rapporteras.

Som hjälpmedel vid undersökningen av reaktionerna kan användas en binokulärlupp, ficklampa, biomikroskop eller annan lämplig utrustning. Efter det att observationerna har registrerats vid 24 timmar efter tillförseln, kan ögonen undersökas ytterligare med hjälp av fluorescein.

Graderingen av okulär respons är oundgängligen subjektiv. För att främja en tillnärmning av graderingen av okulär respons, och som stöd för testningslaboratorier och alla som är med om att utföra och tolka observationer, bör den personal som gör observationsarbetet få tillbörlig utbildning om klassificeringssystemet.

DATA OCH RAPPORTERING

Utvärdering av resultaten

Klassificeringen av okulär respons bör göras med hänsyn till skadornas natur och allvarlighetsgrad samt deras reversibilitet eller irreversibilitet. Individuella klassificeringsresultat representerar ingen absolut standard för en kemikalies förmåga att framkalla irritation, eftersom även andra verkningar av testkemikalien utvärderas. Enskilda klassificeringsresultat bör i stället ses som referensvärden, och de är meningsfulla endast när de åtföljs av en fullständig beskrivning och utvärdering av alla observationer.

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande information:

Motivering för in vivo-testning: weight-of-evidence-analys av tidigare befintliga data, inbegripet resultat från ett förfarande enligt strategin för stegvis testning, enligt följande:

- Beskrivning av relevanta data som erhållits före testningen.
- Data som erhållits vid de olika stegen enligt testningsstrategin.
- Beskrivning av utförda in vitro-test, inbegripet detaljerade uppgifter om förfaranden och resultat som erhållits med test- och referenskemikalier.
- Beskrivning av utförda in vivo-test med avseende på hudirritation/hudkorrosion, inbegripet de resultat som erhållits.
- Weight-of-the-evidence-analys för utförandet av in vivo-test.

Testkemikalie:

- Identifieringsdata (t.ex. kemisk beteckning och CAS-nummer om detta är känt, renhet, kända föroreningar, källa, satsnummer).
- Fysikalisk natur och fysikalisk-kemiska egenskaper (till exempel pH, flyktighet, löslighet, stabilitet, reaktivitet med vatten).
- Om det rör sig om en blandning bör beståndsdelarna identifieras, inklusive identifieringsdata om ingående ämnen (t.ex. kemiska beteckningar och CAS-nummer om detta är känt) samt deras koncentrationer.
- Dos.

Vehikel:

- Identifieringsdata, koncentration (om tillämpligt), volym som har använts.
- Motivering för val av vehikel.

Försöksdjur:

- Art och stam som har använts, motivering om albinokanin inte har använts.
- Djurens ålder, enskilt för varje djur vid testets start.
- Antalet djur per kön i test- och kontrollgrupperna (vid behov).
- De enskilda djurens vikt vid testets start och slut.
- Ursprung, inhysning, foder etc.

Bedövning och smärtstillande medel

- Doser och tidpunkter när topisk/lokal bedövning och systemiska smärtstillande medel gavs.
- Om topisk/lokal bedövning används, anges identifieringsdata, renhet, typ och potentiell växelverkan med testkemikalien.

Resultat:

- Beskrivning av den metod som har använts för att klassificera irritationen vid varje observationstidpunkt (till exempel ficklampa, biomikroskop, fluorescein).
- En sammanställning i tabellform av responsdata rörande irritation/korrosion för varje djur vid varje observationstidpunkt fram till dess att testningen avslutas för det djurets del.
- Narrativ beskrivning av graden och naturen hos den irritation eller korrosion som har observerats.
- Beskrivning av alla andra eventuella ögonskador som har observerats (till exempel vaskularisering, pannusbildning, adhesioner, missfärgning).
- Beskrivning av icke-okulära lokala och systemiska skadliga verkningar, register över kliniska tecken på smärta och lidande, digitala fotografier och, i förekommande fall, histopatologiska fynd.

*Diskussion av resultaten.***Tolkning av resultaten.**

En extrapolering av resultaten från undersökningar av ögonirritation som gjorts på försöksdjur är valid endast till en begränsad utsträckning. I många fall är albinokaniner mycket känsligare än människor i fråga om ämnen som är irriterande eller korrosiva för ögat.

Särskild noggrannhet bör iakttas vid tolkning av resultaten i syfte att utesluta irritation som beror på en sekundär infektion.

LITTERATUR

- (1) Barratt, M.D., m.fl. (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard, ECVAM Workshop Report 8, ATLA 23, 410–429.
- (2) de Silva, O., m.fl. (1997), Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies, Food Chem. Toxicol. 35, 159–164.
- (3) Worth A.P. och Fentem J.H. (1999), A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161–177.
- (4) Young, J.R., m.fl. (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., m.fl. (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 denna bilaga, Akut hudirritation/hudkorrosion.
- (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 E.M., Marcella K.L., Woodson J.F. (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 denna bilaga, *in vitro*-test av hudkorrosivitet: Bestämning av transkutant elektriskt motstånd (TER).
- (14) Kapitel B.40a i denna bilaga, *in vitro*-test av hudkorrosivitet: Test med modell av human hud.
- (15) OECD (2006), *Test nr 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 denna bilaga, testmetoden BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability) för identifiering av i) kemikalier som orsakar allvarlig ögonskada och ii) kemikalier för vilka det inte krävs klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada.
- (17) Kapitel B.48 i denna bilaga, testmetoden ICE (Isolated Chicken Eye Test) för identifiering av i) kemikalier som orsakar allvarlig ögonskada och ii) kemikalier för vilka det inte krävs klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada.
- (18) U.S. EPA (2003), Label Review Manual: tredje upplagan, EPA737-B-96-001, Washington, DC: U.S., Environmental Protection Agency.
- (19) FN (2011) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), fjärde reviderade upplagan, New York och Genève: United Nations Publications.
- (20) Europeiska kommissionen (2008), Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 2008/EEG och 67/548/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1999/45. EUT L 353, s. 1.
- (21) ECHA, Guidance on information requirements and chemical safety assessment, kapitel R.7a: Särskild vägledning om endpoints:

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

Tabell 1

Gradering av okulära skador

Hornhinna (kornea)	Grad
Opacitet: graden av densitet (avläsningarna bör göras på området med den högsta densiteten) (*).	
Ingen ulceration eller opacitet.	0
Spridda eller diffusa områden med opacitet (annan än svag avmattning av den normala lys-ten), detaljer av iris klart synliga.	1
Enkelt skönjbart translucent område, detaljerna i iris är lätt förmörkade.	2
Pärlemorliknande område, inga detaljer i iris synliga, pupillens storlek kan knappt skönjas.	3

Hornhinna (kornea)	Grad
Opak hornhinna, iris kan inte skönjas genom opaciteten.	4
Maximum: 4	
Iris	
Normal	0
Märkbart fördjupade rugae, blodstockning, svullnad, måttlig hyperemi kring kornea eller injektion, iris reagerar för ljus (en långsam reaktion bedöms som en verkning).	1
Blödning, kraftig destruktion eller ingen reaktion på ljus.	2
Maximum: 2	
Konjunktiva	
Rodnad (hänför sig till palpebral och bulbär konjunktiva, exklusive hornhinnan och iris).	
Normal	0
Vissa blodkärl är hyperemiska (injekterade).	1
Diffus, blodröd färg, individuella blodkärl kan inte skönjas med lätthet.	2
Diffust köttröd.	3
Maximum: 3	
Chemos	
Svullnad (hänför sig till ögonlocken och/eller blinkhinnor)	
Normal	0
En viss svullnad över det normala.	1
Klar svullnad, delvis eversion av ögonlocken.	2
Svullnad, ögonlocken ungefär halvstängda.	3
Svullnad, ögonlocken mer än halvstängda.	4
Maximum: 4	
(*) Området för hornhinneopacitet bör noteras	

Tillägg

DEFINITIONER

Syra-/bas-reserven: För sura beredningar är detta den mängd (g) natriumhydroxid/100 g beredning som krävs för att producera ett specificerat pH. För alkaliska beredningar är det den mängd (g) natriumhydroxid som motsvarar den mängd svavelsyra (g)/100 g beredning som krävs för att producera ett specificerat pH (Young m.fl. (1988).

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Icke-irriterande ämnen: ämnen som inte klassificeras som okulärt irriterande enligt EPA-kategorierna I, II eller III eller ögonirriterande enligt GHS-kategorierna 1, 2, 2A eller 2B eller EU-kategorierna 1 eller 2 (17) (18) (19).

Kemikalier som är frätande för ögonen: a) kemikalier som orsakar irreversibel vävnadsskada på ögat, b) kemikalier som klassificeras som ögonirriterande enligt GHS-kategori 1 eller enligt EPA-kategori I eller EU-kategori 1 (17) (18) (19).

Ögonirriterande kemikalier: a) kemikalier som orsakar en reversibel förändring i ögat, b) kemikalier som klassificeras som ögonirriterande enligt EPA-kategori II eller III eller GHS-kategorierna 2, 2A eller 2B eller CLP-kategori 2 (17) (18) (19).

Kraftigt ögonirriterande kemikalier: a) kemikalier som orsakar vävnadsskada i ögat som inte läker inom 21 dagar från appliceringen eller orsakar allvarig synnedsättning, b) kemikalier som klassificeras som ögonirriterande enligt GHS-kategori 1 eller EPA-kategori I eller CLP-kategori 1 (17) (18) (19).

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

Stegvis metod: en strategi för stegvis testning där all befintlig information om en testkemikalie granskas i en angiven ordning, med användning av förfarandet med sammanvägd bedömning (weight of evidence) för att avgöra om det finns tillräckligt med information till hands för att besluta om faroklassificering innan man går vidare till nästa steg. Om testkemikaliens förmåga att framkalla irritation kan fastställas på grundval av befintlig information behövs ingen ytterligare testning. Om testkemikaliens förmåga att framkalla irritation inte kan fastställas på grundval av befintlig information genomförs ett stegvis sekventiellt djurförsöksförfarande tills att det går att fastställa en otvetydig klassificering.

Weight-of-the-evidence (process): Styrkor och svagheter hos en samling uppgifter som används som underlag för en slutsats som kanske inte framgår av de individuella uppgifterna.

TILLÄGG TILL TESTMETOD B.5 ⁽¹⁾**STRATEGI FÖR STEGVIS TESTNING MED AVSEENDE PÅ ÖGONIRRITATION OCH ÖGONKORROSION****Allmänna överväganden**

För en sund vetenskaplig praxis och för djurens välbefinnande är det viktigt att undvika onödig användning av djur, och minimera all testning som sannolikt framkallar allvarlig respons hos djuren. All information som är relevant för en kemikalies förmåga att framkalla ögonkorrosion/ögonirritation bör utvärderas innan in vivo-testning övervägs. Det kanske redan finns tillräckliga bevis för att klassificera en testkemikalie med avseende på dess förmåga att framkalla ögonkorrosion eller ögonirritation, utan behov av testning på laboratoriedjur. Man kan därför, genom att använda en weight-of-the-evidence-analys och följa strategin för stegvis testning, minimera behovet av in vivo-testning, särskilt i fråga om kemikalier som sannolikt framkallar allvarliga reaktioner.

Det rekommenderas att en weight-of-the-evidence-analys används för att utvärdera befintlig information om olika kemikaliers förmåga att framkalla ögonirritation eller ögonkorrosion. Därefter kan man avgöra om det behövs ytterligare undersökningar, andra än in vivo-test, som hjälp för att karakterisera sådan egenskap. I fall där ytterligare undersökningar behövs, rekommenderas ett förfarande enligt strategin för stegvis testning för att få fram relevanta försöksdata. För ämnen som inte har testats tidigare bör strategin för stegvis testning följas för att få fram de data som behövs för att utvärdera ämnets förmåga att framkalla ögonkorrosion eller ögonirritation. Den inledande testningsstrategi som beskrivs i detta tillägg har utarbetats inom ramen för en OECD-arbetsgrupp (1). Strategin bekräftades och utvidgades senare i *Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances*, i den form systemet godkändes av vid det 28:e gemensamma mötet för kemikaliekommittén och kemikaliearbetsgruppen (Chemicals Committee och Working Party on Chemicals), i november 1998 (2) och uppdaterades av en OECD-expertgrupp 2011.

Även om denna testningsstrategi inte ingår som en del av testmetod B.5, är den ett uttryck för de rekommenderade principerna för bestämning av ett ämnes förmåga att framkalla ögonirritation eller ögonkorrosion. Dessa principer representerar både bästa praxis och etiska riktlinjer för in vivo-testning med avseende på ögonirritation/ögonkorrosion. Testmetoden är en vägledning för utförandet av test in vivo, och utgör en sammanfattning av de faktorer som bör beaktas innan ett sådant test övervägs. Inom ramen för strategin för stegvis testning används weight-of-the-evidence-analyser för utvärderingen av befintliga data om olika testkemikaliers egenskaper med avseende på ögonirritation/ögonkorrosion. Samtidigt fås tillgång till en stegvis metod för generering av relevanta data om kemikalier för vilka det krävs ytterligare testning eller för ämnen som ännu inte har testats. Enligt strategin utför man först validerade och godkända in vitro- eller ex vivo-tester och därefter görs undersökningar enligt TM B.4 under specifika omständigheter (3) (4).

Beskrivning av den stegvisa testningsstrategin

Innan testning utförs som en del av förfarandet enligt strategin för stegvis testning (se figuren), bör all tillgänglig information utvärderas i syfte att fastställa behovet av in vivo-test på ögonen. Trots att signifikant information kan fås genom utvärdering av enskilda parametrar (till exempel extrema pH-värden), bör den tillgängliga informationen utvärderas som en helhet. Alla relevanta data om den berörda kemikalien och dess strukturella analogers verkningar bör utvärderas när man fattar ett beslut grundat på en weight-of-the-evidence-analys, och en motivering för beslutet bör anges. Huvudvikten bör läggas vid befintliga data om kemikalien (både i fråga om människor och djur). Därefter följer resultatet av testning in vitro eller ex vivo. Testning in vivo av korrosiva kemikalier bör alltid undvikas när det är möjligt. Till de faktorer som bör beaktas inom ramen för testningsstrategin hör följande:

Utvärdering av befintliga data rörande människor och/eller djur och eller in vitro-data från validerade och internationellt vedertagna metoder (steg 1).

⁽¹⁾ Om en integrerad testningsstrategi tillämpas med avseende på ögonirritation enligt Reach, se även Echas vägledning om informationskrav och kemikaliesäkerhetsbedömningar, kapitel R.7a: Särskild vägledning om endpoints: http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

Befintliga data rörande människor, till exempel kliniska undersökningar eller undersökningar inom arbetslivet och fallstudier, och/eller djurförsöksdata från ögonstudier och/eller in vitro-data från validerade och internationellt vedertagna metoder för ögonirritation/ögonkorrosion bör beaktas först, eftersom de ger tillgång till information som direkt hör samman med verkningarna på ögonen. Därefter bör tillgängliga data från undersökningar på människor och/eller djur med avseende på hudkorrosion/hudirritation och/eller in vitro-data från validerade och internationellt vedertagna metoder för hudkorrosion utvärderas. Kemikalier med kända korrosiva egenskaper eller kemikalier som är kraftigt ögonirriterande bör inte appliceras på djurs ögon. Detsamma gäller kemikalier som ger korrosiva eller kraftigt irriterande verkningar på huden. Sådana kemikalier bör anses vara korrosiva och/eller irriterande även för ögonen. Om resultaten från tidigare utförda ögonstudier visar att en kemikalie inte är korrosiv eller irriterande, bör den inte heller testas på ögonen in vivo.

Analys av struktur-aktivitetssamband (SAR) (steg 2).

I mån av tillgänglighet bör resultaten från testning av strukturellt närbesläktade ämnen beaktas. Om det finns tillgång till data rörande människa och/eller djur för strukturellt närbesläktade ämnen eller blandningar av sådana ämnen, och dessa data är tillräckliga för att indikera att dessa ämnen har förmåga att framkalla ögonkorrosion/ögonirritation, kan man anta att testkemikalien kommer att framkalla samma respons. I sådana fall behöver kemikalien eventuellt inte testas. Negativa data från undersökningar med strukturellt närbesläktade ämnen eller blandningar av sådana ämnen utgör inte, inom ramen för strategin för stegvis testning, tillräckliga bevis på att en kemikalie skulle sakna korrosiva eller irriterande egenskaper. Validerade och godkända metoder som bygger på struktur-aktivitetssamband bör användas för att identifiera förmågan att framkalla korrosion och irritation på huden och ögonen.

Fysikalisk-kemiska egenskaper och kemisk reaktivitet (steg 3).

Kemikalier med extrema pH-värden såsom $\leq 2,0$ eller $\geq 11,5$ kan ha kraftiga lokala verkningar. Om ett extremt pH-värde används som grund för att konstatera att en kemikalie är korrosiv eller irriterande för ögonen, behöver eventuellt också ämnets syra/bas-reserv (buffertkapacitet) beaktas (5) (6) (7). Om buffertkapaciteten tyder på att kemikalien eventuellt inte är korrosiv för ögonen (dvs. kemikalier med extremt pH och låg syra-/basreserv), bör ytterligare testning utföras för att bekräfta detta. Härvid bör man helst använda validerade och godkända in vitro- eller ex vivo-tester (se punkt 10).

Beaktande av annan befintlig information (steg 4).

I detta steg bör man beakta all tillgänglig information om systemisk toxicitet när ett ämne tillförs via huden. Även testkemikaliens akuta toxicitet för huden bör beaktas. Om testkemikalien har konstaterats vara mycket toxisk när det tillförs via huden, behöver det eventuellt inte testas på ögonen. Även om det inte nödvändigt finns ett förhållande mellan akut toxicitet för huden och förmåga att framkalla ögonirritation/ögonkorrosion, kan man anta att ett ämne som har hög toxicitet vid tillförsel via huden, även har hög toxicitet när ämnet tillförs i ögonen. Sådana data kan även beaktas mellan steg 2 och steg 3.

Bedömning av kemikaliens hudkorrosion krävs även för tillsynsändamål (steg 5).

Kemikaliens förmåga att framkalla ögonkorrosion/ögonirritation bör först utvärderas med användning av testmetod B.4 (4) och dess tillägg (8), inklusive validerade och internationellt vedertagna metoder för in vitro-testmetoder med avseende på hudkorrosion (9) (10) (11). Om kemikalien veterligen framkallar korrosion eller allvarlig hudirritation, bör det betraktas som frätande eller kraftigt ögonirriterande. Då krävs inga ytterligare tester. Om kemikalien inte är korrosiv eller kraftigt irriterande för huden, bör ögontest in vitro eller ex vivo utföras.

Resultat från in vitro- eller ex vivo-test (steg 6).

Kemikalier som har visat sig framkalla korrosion eller kraftig irritation i ett in vitro- eller ex vivo-test (12) (13) som har validerats och godkänts specifikt för utvärdering av korrosion eller irritation på ögonen, behöver inte testas på djur. Man kan anta att sådana kemikalier framkallar liknande allvarliga verkningar in vivo. Om det inte finns tillgång till resultat från validerade och godkända in vitro- eller ex vivo-test, ska man hoppa över steg 6 och fortsätta förfarandet direkt från steg 7.

In vivo-test på kanin (steg 7 och 8).

In vivo-ögon-test bör börja med ett preliminärt test på ett enskilt djur. Om resultatet av ett sådant test tyder på att kemikalien framkallar korrosion eller kraftig irritation i ögat, bör ingen ytterligare testning utföras. Om testresultatet tyder på att ämnet inte framkallar korrosion eller kraftig irritation, utförs ett bekräftande test med ytterligare två djur. Ytterligare tester kan behövas beroende på resultatet av det bekräftande testet [se testmetod B.5].

TESTNINGS- OCH UTVÄRDERINGSSTRATEGI FÖR ÖGONIRRITATION/ÖGONKORROSION

	Aktivitet	Iakttagelse	Slutsats
1	Befintliga data rörande människor och/eller djur och eller in vitro-data från validerade och internationellt vedertagna metoder som visar verkningar på ögonen. Befintliga data rörande människor och/eller djur och eller in vitro-data från validerade och internationellt vedertagna metoder som visar hudkorrosion. Befintliga data rörande människor och/eller djur och eller in vitro-data från validerade och internationellt vedertagna metoder som visar kraftig hudirritation.	Allvarlig skada på ögonen. Irriterande för ögonen. Ej frätande eller irriterande för ögonen. Frätande för huden. Framkallar kraftig irritation på huden.	Apikal endpoint, bör anses vara frätande för ögonen. Ingen testning behövs. Apikal endpoint, bör anses vara irriterande för ögonen. Ingen testning behövs. Apikal endpoint, bör anses vara icke-frätande och icke-irriterande för ögonen. Ingen testning behövs. Bör antas vara frätande för ögonen. Ingen testning behövs. Bör antas vara irriterande för ögonen. Ingen testning behövs.



Ingen information tillgänglig, eller så är den tillgängliga informationen inte avgörande.



2	Undersök struktur-aktivitetssamband för ögonkorrosion/ögonirritation. Överväg struktur-aktivitetssamband för hudkorrosion.	Allvarlig skada på ögonen kan förutses. Irritation på ögonen kan förutses. Korrosivitet för huden kan förutses.	Bör antas vara frätande för ögonen. Ingen testning behövs. Bör antas vara irriterande för ögonen. Ingen testning behövs. Bör antas vara frätande för ögonen. Ingen testning behövs.



Inga verkningar kan förutspås eller det som kan förutspås är inte avgörande eller negativt.



3	Mätning av pH (buffertkapacitet, om relevant).	pH ≤ 2 eller ≥ 11,5 (med hög buffertkapacitet, om relevant).	Bör antas vara frätande för ögonen. Ingen testning behövs.



2 < pH < 11,5 eller pH ≤ 2,0 eller ≥ 11,5 med låg buffertkapacitet, om relevant.



	Aktivitet	Iakttagelse	Slutsats
4	Överväg befintliga data om systemisk toxicitet via huden.	Kraftigt toxisk vid koncentrationer som skulle användas vid test på ögonen.	Kemikalien är för toxisk för att testas. Ingen testning behövs.
	↓ <i>Sådan information är inte tillgänglig eller kemikalien har inte mycket hög toxicitet.</i>		
5	Experimentell bedömning av förmågan att framkalla hudkorrosion enligt testningsstrategin i kapitel B.4 i denna bilaga, om detta även krävs för tillsynsändamål.	Korrosiv eller kraftigt irriterande respons	Antag att kemikalien är ögonkorrosiv. Ingen ytterligare testning behövs.
	↓ <i>Kemikalien är inte korrosiv eller kraftigt irriterande för huden</i>		
6	Utför validerade och godkända ögontest in vitro eller ex vivo.	Korrosiv eller kraftigt irriterande respons Irriterande respons Icke-irriterande respons	Antag att kemikalien är korrosiv eller kraftigt irriterande för ögonen, under förutsättning att det utförda testet kan användas för att identifiera korrosiva/kraftigt irriterande kemikalier och kemikalien omfattas av testets tillämpningsområde. Ingen ytterligare testning behövs. Antag att kemikalien är ögonirriterande, under förutsättning att det eller de utförda testen kan användas för att korrekt identifiera korrosiva, kraftigt irriterande och irriterande kemikalier och kemikalien omfattas av testet eller testernas tillämpningsområde. Ingen ytterligare testning behövs. Antag att kemikalien inte är ögonirriterande, under förutsättning att det eller de utförda testen kan användas för att korrekt identifiera ej irriterande kemikalier och korrekt särskilja dessa kemikalier från kemikalier som är irriterande, kraftigt irriterande eller korrosiva för ögonen, och kemikalien omfattas av testets tillämpningsområde. Ingen ytterligare testning behövs.
	↓ <i>Validerade och godkända ögontest(er) in vitro eller ex vivo kan inte användas för att dra slutsatser.</i>		
7	Utför preliminärt in vivo-test på kaninöga med ett individuellt djur.	Allvarlig skada på ögonen.	Anses vara korrosiv för ögonen. Ingen ytterligare testning behövs.
	↓ <i>Ingen allvarlig skada, eller ingen respons</i>		

	Aktivitet	Iakttagelse	Slutsats
8	Utför bekräftande test på ytterligare ett eller två djur.	Korrosiv eller irriterande	Anses vara korrosiv eller irriterande för ögonen. Ingen ytterligare testning behövs.
		Ej korrosiv eller irriterande	Anses inte vara irriterande och korrosiv för ögonen. Ingen ytterligare testning behövs.

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. Anordnades i Solna, Sverige den 22–24 januari 1996 (<http://www.oecd1.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. och Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161–177.
- (4) Kapitel B.4 i denna bilaga, Akut hudirritation/hudkorrosion.
- (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. och 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) Tillägg till kapitel B.4 i denna bilaga, Stegvis testningsstrategi för hudirritation och hudkorrosion.
- (9) Kapitel B.40 i denna bilaga, *in vitro*-test av hudkorrosivitet: bestämning av transkutant elektriskt motstånd (TER).
- (10) Kapitel B.40a i denna bilaga, *in vitro*-test av hudkorrosivitet: test med modell av human hud.
- (11) OECD (2006), Test nr 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, avsnitt 4, OECD Paris.
- (12) Kapitel B.47 i denna bilaga, testmetoden BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability) för identifiering av i) kemikalier som orsakar allvarlig ögonskada och ii) kemikalier för vilka det inte krävs klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada.
- (13) Kapitel B.48 i denna bilaga, testmetoden ICE (Isolated Chicken Eye Test) för identifiering av i) kemikalier som orsakar allvarlig ögonskada och ii) kemikalier för vilka det inte krävs klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada.”

(3) I del B ska kapitel B.10 ersättas med följande:

"B.10 Test in vitro av kromosomavvikelser hos däggdjur

INLEDNING

Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje 473 (2016). Det är en del av en serie av testmetoder för genetisk toxikologi. Ett OECD-dokument som ger kortfattad information om tester inom genetisk toxikologi och en översikt över de senaste ändringarna av dessa testriktlinjer har utarbetats (1).

Syftet med test in vitro av kromosomavvikelser hos däggdjur är att identifiera kemikalier som orsakar strukturella kromosomavvikelser hos odlade däggdjursceller (2) (3) (4). Strukturella avvikelser kan vara av två typer, kromosomala eller kromatida. Polyploidi (inklusive endoreduplicering) kan uppstå vid tester av kromosomavvikelser in vitro. Aneugener kan framkalla polyploidi, men enbart polyploidi tyder inte på aneugen potential, och kan helt enkelt tyda på störningar i cellcykeln eller cytotoxicitet (5). Detta test är inte utformat för att mäta aneuploidi. Mikrokärntest in vitro (6) rekommenderas för detektering av aneuploidi.

Test av kromosomavvikelser in vitro kan göras med kulturer av etablerade cellinjer eller primära cellkulturer från människor eller gnagare. De celler som används bör väljas ut på grundval av tillväxtförmåga vid odling, karyotypens stabilitet (inklusive antalet kromosomer) och den spontana frekvensen av kromosomavvikelser (7). De uppgifter som finns tillgängliga för närvarande tillåter inte bestämda rekommendationer, men de tyder på att det i utvärderingen av kemiska faror är viktigt att överväga p53-status, genetisk stabilitet (karyotyp) samt DNA-cellernas återhämtningskapacitet och ursprung (gnagare jämfört med människa) hos de celler som väljs ut för testning. Om denna testmetod används bör man överväga hur dessa och andra cellegenskaper inverkar på cellinjen för att upptäcka kromosomavvikelser, allteftersom kunskapen utvecklas på detta område.

Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

För testning in vitro krävs i regel ett exogent system för metabolisk aktivering, om cellerna inte är metaboliskt kompetenta i fråga om de ämnen som testas. Det exogena metaboliska aktiveringssystemet efterliknar inte helt förhållandena in vivo. Man bör också se till att undvika sådana förhållanden som leder till artefaktiska positiva resultat, dvs. kromosomskador som inte är orsakade av direkt samverkan mellan testkemikalierna och kromosomerna. Sådana förhållanden kan vara ändringar av pH eller osmolalitet (8) (9) (10), samverkan mellan mediets komponenter (11) (12) eller för hög cytotoxicitet (13) (14) (15) (16).

Detta test används för att detektera kromosomavvikelser som kan utlösas av klastogena händelser. Analysen av induktion av kromosomavvikelser bör göras med hjälp av celler i metafas. Det är därför viktigt att mitos har inträffat i både de behandlade och obehandlade odlingarna. Tillverkade nanomaterial kan kräva särskilda anpassningar av testmetoden, men de beskrivs inte här.

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

TESTPRINCIP

Cellodlingar från människa eller däggdjur exponeras för testkemikalien både med och utan exogent metaboliskt aktiveringssystem, utom om de celler som används har tillräcklig metaboliserande kapacitet (se punkt 13). Vid lämpliga förutbestämda intervall, efter det att cellodlingen har exponerats för testkemikalien, utförs behandling med ett ämne som stoppar celldelningen i metafase (t.ex. colcemid eller colchicin). Därefter skördas cellerna och färgas in, varpå närvaro av kromatid- och kromosomavvikelser i metafascellerna analyseras mikroskopiskt.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Förberedelser*Celler*

En mängd olika cellinjer kan användas (t.ex. äggstocksceller från kinesisk hamster (CHO), lungceller från kinesisk hamster V79, lungceller från kinesisk hamster (CHL)/IU, TK6) eller primära cellodlingar, inklusive perifera blodlymfocyter från människa eller andra däggdjur (7). Valet av använda cellinjer bör vara vetenskapligt motiverat. Om primära celler används av djurskyddsskäl bör man när så är möjligt överväga användning av primära celler med mänskligt ursprung som samlas in enligt humana etiska principer och föreskrifter. Humana perifera blodlymfocyter bör tas från unga rökfria personer (cirka 18–35 år) utan kända sjukdomar som inte nyligen har exponerats för genotoxiska läkemedel (t.ex. kemikalier, joniserande strålning) vid nivåer som skulle öka den bakomliggande incidensen av kromosomavvikelser. Detta garanterar att den bakomliggande incidensen av kromosomavvikelser är låg och konstant. Förekomsten av kromosomavvikelser ökar med åldern och denna tendens är mer markerad hos kvinnor än hos män (17) (18). Om celler från fler än en givare poolas för användning bör antalet givare anges. Man måste kunna påvisa att cellerna har delat sig från det att behandlingen med testkemikalien påbörjades fram till provtagningen av cellerna. Cellodlingarna hålls i en exponentiell celltillväxtfas (cellinjer) eller stimuleras så att de delar sig (primära lymfocytodlingar). Syftet med detta är att exponera cellerna i olika stadier av cellcykeln eftersom cellstadiernas känslighet för testkemikalierna kanske inte är känd. De primära celler som måste stimuleras med mitogena medel för att dela sig är i regel inte längre synkroniserade under exponeringen för testkemikalien (t.ex. humana lymfocyter efter mitogenisk stimulans i 48 timmar). Användning av synkroniserade celler under behandling rekommenderas inte, men kan vara godtagbar om det är motiverat.

Medier och odlingsbetingelser

Lämpliga odlingsmedier och inkubationsförhållanden (odlingskärl, luftfuktighet på 5 % CO₂ i förekommande fall, inkubationstemperatur på 37 °C) bör väljas för odlingarna. Etablerade cellinjer och stammar bör rutinemässigt kontrolleras med avseende på det modala kromosomantalets stabilitet och frånvaro av kontaminerad mykoplasma (7) (19), och får inte användas om kontamination har skett eller om det modala kromosomantalet har ändrats. Cellernas normala cellcykeltid eller den normala cellcykeltiden hos de primära kulturer som används i testlaboratoriet bör fastställas och bör överensstämma med kända cellegenskaper (20).

Beredning av odlingarna

Cellinjer: celler förökas från stamkulturer, sås ut i ett odlingsmedium som har en sådan densitet att celler i suspension eller monolager fortsätter att växa exponentiellt fram till skörd (konfluens av celler som växer i monolager bör undvikas).

Lymfocyter: helblod, behandlat med en antikoagulant (t.ex. heparin) eller så odlas separerade lymfocyter (t.ex. 48 timmar för humana lymfocyter) i närvaro av en mitogen [t.ex. fytohemagglutinin (PHA) för humana lymfocyter] för att framkalla celldelning innan cellerna exponeras för testkemikalien.

Metabolisk aktivering

Exogena metaboliserande system bör användas när cellerna inte har tillräcklig endogen metabolisk kapacitet. Det mest använda systemet, som rekommenderas som standard om inte annat kan motiveras, är en kofaktorstött post-mitokondriell fraktion (S9) beredd ur lever från gnagare (vanligen råttor) som behandlats med enzyminducerande ämnen såsom Aroclor 1254 (21) (22) (23) eller en kombination av fenobarbital och β -naftoflavon (24) (25) (26) (27) (28) (29). Den senare kombinationen bryter inte mot Stockholmkonventionen om långlivade organiska föroreningar (30) och har visat sig vara lika effektiv som Aroclor 1254 när det gäller att inducera monooxygenaser ("mixed-function oxidases") (24) (25) (26) (28). S9-fraktionen används vanligen i koncentrationer mellan 1–2 volymprocent men kan ökas till 10 volymprocent i det slutliga testmediet. Användning av produkter som minskar det mitotiska indexet, särskilt kalciumkomplexprodukter (31), bör undvikas under behandlingen. Valet av typ och koncentration av använt exogent metaboliskt aktiveringssystem eller metabolisk induktion kan påverkas av den kemikalieklass som testas.

Beredning av testkemikalien

Fasta testkemikalier bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och vid behov spädas ut innan cellerna behandlas (se punkt 23). Flytande testkemikalier kan tillsättas direkt till testsystemet och/eller spädas ut före behandling av testsystemet. Gaser eller flyktiga testkemikalier bör testas genom lämpliga modifikationer av standardprotokollen, såsom behandling i slutna odlingskärl (32) (33) (34). Testkemikalien bör beredas strax innan behandling om inte stabilitetsdata visar att lagringen är acceptabel.

Testbetingelser

Lösningsmedel

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

Mätning av cellproliferation och cytotoxicitet och val av exponeringskoncentrationer

Vid bestämning av den högsta testkemikaliekoncentrationen bör man undvika koncentrationer som kan ge artefaktiska positiva resultat, t.ex. för kraftig cytotoxicitet (se punkt 22), utfällning i odlingsmediet (se punkt 23) eller markerade ändringar av pH eller osmolalitet (se punkt 5). Om testkemikalien orsakar en markerad ändring av pH i mediet vid tillsättnings tidpunkten kan pH justeras, företrädesvis genom buffring av det slutliga behandlingsmedlet för att undvika artefaktiska positiva resultat och upprätthålla lämpliga odlingsförhållanden.

Cellproliferationen bör mätas för att se till att ett tillräckligt antal behandlade celler har nått mitos under försöket och att behandlingarna görs på lämpliga nivåer av cytotoxicitet (se punkterna 18 och 22). Cytotoxicitet bör fastställas med och utan metabolisk aktivering i huvudförsöket med hjälp av lämplig indikation på celledöd och tillväxt. Även om det kan vara användbart att utvärdera cytotoxicitet i ett preliminärt test för att bättre definiera de koncentrationer som ska användas i huvudförsöket är ett preliminärt test inte obligatoriskt. Om ett preliminärt test utförs bör det inte ersätta mätning av cytotoxicitet i huvudförsöket.

Relativ populationsfördubblingstid (RPD) eller relativ ökning av celltal (RICC) är lämpliga metoder för bedömning av cytotoxicitet i cytogenetiska tester (13) (15) (35) (36) (55) (se tillägg 2 för formuler). Om behandlings- och provtagningstiderna är långa efter det att behandlingen inletts kan cellcykellängder som är längre än 1,5 normala cellcykellängder (dvs. längre än totalt tre cellcykellängder) leda till en underskattning av cytotoxiteten om RPD används (37). Under dessa omständigheter kan RICC vara ett bättre mått. RPD kan dock även vara användbart för att utvärdera utvecklingen av cytotoxicitet efter 1,5 normala cellcykellängder.

När det gäller lymfocyter i primära odlingar är mitotiskt index (MI) ett mått på cytotoxiska/cytostatiska verkningar. Det påverkas dock av mätningstidpunkten efter behandling, använt mitogen och eventuella störningar i cellcykeln. MI är dock godtagbart eftersom andra cytotoxiska mätningar kan vara besvärliga och opraktiska och kanske inte går att använda för målpopulationen av lymfocyter som växer till följd av PHA-stimulering.

Rekommenderade cytotoxicitetsparametrar är således RICC och RPD för cellinjer och MI för primära odlingar av lymfocyter. Andra indikatorer (t.ex. cellintegritet, apoptos, nekros och cellcykel) kan ge värdefull kompletterande information.

Minst tre testkoncentrationer (exklusive lösningsmedel och positiva kontroller) som uppfyller acceptanskriterierna (lämplig cytotoxicitet, antal celler osv.) bör utvärderas. Oavsett celltyp (cellinjer eller primära odlingar av lymfocyter) kan antingen replikat eller enstaka behandlade kulturer användas för varje testad koncentration. Två identiska kulturer rekommenderas, men enstaka kulturer är också godtagbara under förutsättning att samma totala antal celler registreras för enstaka som för dubbla kulturer. Användning av enstaka kulturer är särskilt relevant när fler än tre koncentrationer utvärderas (se punkt 31). De resultat som erhöles i de oberoende replikatodlingarna vid en given koncentration kan slås ihop för dataanalysen (38). För testkemikalier med låg eller ingen cytotoxicitet är två- till trefaldiga koncentrationsintervall vanligen lämpliga. Om testkemikalien är cytotoxisk bör de valda testkoncentrationerna täcka ett relevant intervall för cytotoxiciteten enligt beskrivningen i punkt 22 och omfatta koncentrationer med måttlig, låg eller ingen cytotoxicitet. Många testkemikalier uppvisar branta koncentrations-reponskurvor. För att få uppgifter vid låg och måttlig cytotoxicitet eller undersöka dos-responsförhållandet i detalj är det därför nödvändigt att använda mera näraliggande koncentrationer och/eller fler än tre koncentrationer (enstaka kulturer eller replikat) i situationer där försöket måste upprepas (se punkt 47).

Om den maximala koncentrationen baseras på cytotoxicitet bör den högsta koncentrationen syfta till att uppnå $55 \pm 5\%$ cytotoxicitet med hjälp av de rekommenderade cytotoxicitetsparametrarna (dvs. minskning av RICC och RPD för cellinjer och minskning av MI för primära odlingar av lymfocyter till $45 \pm 5\%$ av den parallella negativa kontrollen). Man bör vara försiktig i tolkningen av positiva resultat som endast återfinns i den övre delen av detta cytotoxicitetsintervall på $55 \pm 5\%$ (13).

För svårslösliga testkemikalier som inte är cytotoxiska vid koncentrationer som är lägre än den lägsta olösliga koncentrationen bör den högsta analyserade koncentrationen framkalla grumlighet eller en fällning som är synlig med blotta ögat eller med hjälp av ett inverterat mikroskop vid slutet av behandlingen med testkemikalien. Även om cytotoxicitet förekommer över den lägsta olösliga koncentrationen är det lämpligt att testa endast en koncentration som producerar grumlighet eller har en synlig fällning, eftersom fällningen kan ge artefaktiska effekter. När det gäller koncentrationer som ger fällningar bör man se till att detta inte stör testet (t.ex. färgning eller bestämning). Bestämning av löslighet i odlingsmediet före försöket kan vara användbart.

Om ingen fällning eller begränsande cytotoxicitet observeras ska de högsta testkoncentrationerna motsvara 10 mM, 2 mg/ml eller 2 µl/ml, enligt det som är lägst (39) (40) (41). Om testkemikalien inte har en definierad sammansättning, t.ex. ett ämne med okänd eller variabel sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiskt material (UVCB) (42), miljöextrakt osv., kan man behöva använda en högre toppkoncentration (t.ex. 5 mg/ml) om inte cytotoxiciteten är tillräckligt hög, för att öka koncentrationen för varje komponent. Det bör dock noteras att dessa krav kan skilja sig för humanläkemedel (43).

Kontroller

Parallella negativa kontroller (se punkt 15), bestående av enbart lösningsmedel i behandlingsmediet, och hanterade på samma sätt som behandlingsodlingarna, bör inkluderas varje gång odlingen skördas.

Parallella positiva kontroller behövs för att visa laboratoriets förmåga att identifiera klastogener enligt villkoren i det använda testprotokollet och, i förekommande fall, effektiviteten hos det exogena systemet för metabolisk aktivering. Exempel på positiva kontroller ges i tabell 1 nedan. Alternativa positiva kontrollkemikalier kan användas om det är motiverat. Tester av däggdjursceller in vitro för genetisk toxicitet är tillräckligt standardiserade och de positiva kontrollerna kan därför begränsas till en klastogen som kräver metabolisk aktivering. Förutsatt att denna enstaka positiva kontrollrespons görs samtidigt med det icke-aktiverade testet och med samma behandlingslängd kommer den att visa både aktiviteten hos det metaboliska aktiveringssystemet och testsystemets responsivitet. Separata positiva kontroller bör dock göras av långvariga behandlingar (utan S9) eftersom behandlingstiden skiljer sig från tester med metabolisk aktivering. Varje positiv kontroll bör användas för en eller flera koncentrationer som förväntas ge ökning över bakgrunden som går att reproducera och detektera. Syftet med detta är att visa testsystemets känslighet (dvs. verkningarna är tydliga men avslöjar inte omedelbart identiteten hos de kodade utstryksglasen för avläsaren), och responsen får inte äventyras av cytotoxicitet som överskrider de gränser som anges i testmetoden.

Tabell 1

Rekommenderade referenskemikalier för utvärdering av laboratoriets kompetens att välja positiva kontroller.

Kategori	Kemikalie	CASRN
1. Klastogener utan metabolisk aktivering		
	Metylmetansulfonat	66-27-3
	Mitomycin C	50-07-7
	4-nitrokinolin-N-oxid	56-57-5
	Cytosinarabinosid	147-94-4
2. Klastogener som kräver metabolisk aktivering		
	Benzo(a)pyren	50-32-8
	Cyklofosamid	50-18-0

FÖRFARANDET

Behandling med testkemikalien

Prolifererande celler behandlas med testkemikalien i såväl närvaro som frånvaro av ett system för metabolisk aktivering.

Tid för skörd av odlingen

För en grundlig utvärdering, vilket krävs för en slutsats om ett negativt resultat, bör samtliga tre försöksförhållanden som anges nedan tillämpas i en korttidsbehandling med och utan metabolisk aktivering samt en långtidsbehandling utan metabolisk aktivering (se punkterna 43, 44 och 45):

- Cellerna bör exponeras för testkemikalien utan metabolisk aktivering, under 3–6 timmar och prov bör tas ut vid en tid som motsvarar cirka 1,5 gånger den normala cellcykelns längd efter det att behandlingen har påbörjats (18).
- Cellerna bör exponeras för testkemikalien utan metabolisk aktivering, under 3–6 timmar och prov bör tas ut vid en tid som motsvarar cirka 1,5 gånger den normala cellcykelns längd efter det att behandlingen har påbörjats (18).
- Cellerna bör exponeras kontinuerligt utan metabolisk aktivering tills provtagning under en tidsperiod som motsvarar cirka 1,5 gånger de normala cellcykellängderna. Vissa kemikalier (t.ex. nukleosida analoger) kan vara enklare att detektera vid behandlings-/provtagningstider som är längre än 1,5 cykellängder (24).

Om något av de ovannämnda försöksförhållandena leder till en positiv respons kan andra behandlingssystem behöva övervägas.

Kromosompreparation

Cellkulturer behandlas vanligtvis med colcemid eller colchicin under 1–3 timmar före skörd. Varje cellkultur skördas och behandlas separat för preparationen av kromosomer. Kromosompreparation innefattar hypoton behandling av cellerna, fixering och infärgning. I monolager kan det finnas mitotiska celler (som identifieras genom att de är runda och lösgör sig från ytan) i slutet av behandlingen på 3–6 timmar. Eftersom dessa mitotiska celler enkelt lösgörs, kan de förloras när mediet som innehåller testkemikalien avlägsnas. Om det finns bevis för en betydande ökning av antalet mitotiska celler jämfört med kontrollerna, vilket tyder på en sannolik mitotisk hämning, bör cellerna samlas in genom centrifugering och tillsättas till odlingarna igen, så att man inte förlorar celler som är i mitos och som riskerar kromosomavvikelser vid skördetidpunkten.

Analys

Alla utstryksglas, inklusive de från positiva och negativa kontroller, bör få en oberoende kodning innan den mikroskopiska analysen av kromosomavvikelser utförs. Eftersom fixeringen ofta ger upphov till brott på en del metafaser, med åtföljande förlust av kromosomer, bör de celler som påträffas därför innehålla ett centromerantal på minst $2n \pm 2$, där n är det haploida antalet kromosomer.

Åtminstone 300 väl spridda metafaser bör förekomma per koncentration och kontroll för att man ska kunna dra slutsatsen att testkemikalien är tydligt negativ (se punkt 45). De 300 cellerna bör fördelas lika mellan replikaten när replikatodlingar används. Om enstaka odlingar används per koncentration (se punkt 21) bör minst 300 väl spridda metafaser förekomma i den enstaka odlingen. Fördelen med att använda 300 celler som förekomst är att testets statistiska kraft ökar och nollvärden kommer sällan att observeras (nollvärdet förväntas endast uppgå till 5 %) (44). Antalet påträffade metafaser kan minskas om höga antal celler med kromosomavvikelser observeras och testkemikalien anses vara tydligt positiv.

Celler med strukturella kromosomavvikelser, inklusive och exklusive luckor, ska bedömas. Brott och luckor definieras i tillägg 1 enligt (45) (46). Avvikelser av kromatid- och kromosomtyp bör registreras separat och klassificeras enligt subtyper (brott, utbyten). Laboratoriets förfaranden ska säkerställa att analysen av kromosomavvikelser utförs av välutbildade bedömare och fackgranskas vid behov.

Även om syftet med testet är att detektera strukturella kromosomavvikelser, är det viktigt att notera frekvenserna för polyploid och endoreduplikation när dessa händelser observeras. (Se punkt 2).

Laboratoriets kompetens

För att fastställa att det finns tillräcklig erfarenhet av testet innan det används för rutintestning bör laboratoriet utföra en rad försök med positiva referenskemikalier som agerar via olika mekanismer samt flera negativa kontroller (med användning av olika lösningsmedel/vehiklar). Dessa positiva och negativa kontrollresponser bör överensstämma med litteraturen. Detta gäller inte laboratorier som redan har erfarenhet, dvs. har en historisk databas enligt punkt 37.

Laboratoriet bör undersöka ett urval av positiva kontrollkemikalier (se tabell 1 i punkt 26) med korta och långa behandlingar utan metabolisk aktivering, och även med kort behandlingstid med metabolisk aktivering, för att visa att det har kompetens att upptäcka klastogena kemikalier och bestämma effektiviteten hos det metaboliska aktiveringssystemet. En rad koncentrationer av de valda kemikalierna bör användas för att ge reproducerbara och koncentrationsrelaterade ökningskurvor över bakgrunden i syfte att visa testsystemets sensitivitet och dynamiska omfång.

Historiska kontrolldata

Laboratoriet bör fastställa följande:

- Historiskt positivt kontrollintervall samt fördelning.
- Historiskt negativt (obehandlad, lösningsmedel) kontrollintervall samt fördelning.

Om data för en historisk negativ kontrollfördelning samlas in först bör de parallella negativa kontrollerna överensstämma med publicerade kontrolldata om sådana finns. Allteftersom kontrollfördelningen kompletteras med fler försöksdata bör de parallella negativa kontrollerna i idealfallet ligga inom fördelningens kontrollgräns på 95 % (44) (47). Laboratoriets historiska negativa kontrolldatabas kontroll bör inledningsvis baseras på minst 10 försök, men bör helst bestå av minst 20 försök utförda under jämförbara försöksbetingelser. Laboratorierna bör använda kvalitetskontrollmetoder såsom kontrolldiagram (t.ex. C-diagram eller X-stapelldiagram (48)), för att fastställa hur variabla deras positiva och negativa kontrolldata är och för att visa att metoden är "under kontroll" (44). Fler rekommendationer om hur man bygger upp och använder historiska kontrolldatabaser (t.ex. kriterier för att innefatta och utesluta data samt acceptanskriterier för ett givet försök) finns i litteraturen (47).

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

Negativa kontrolldata bör bestå av förekomsten av celler med kromosomavvikelser från en enda odling eller summan av replikatodlingar enligt beskrivningen i punkt 21. Parallella negativa kontroller bör helst ligga inom kontrollgränsen på 95 % för fördelningen av laboratoriets historiska negativa kontrolldatabas (44) (47). Om parallella negativa kontrolldata faller utanför kontrollgränserna på 95 % kan de ändå ingå i den historiska kontrollfördelningen så länge de inte är extremt avvikande och det finns bevis för att testsystemet är under kontroll (se punkt 37) och att inga tekniska eller mänskliga fel begåtts.

DATA OCH RAPPORTERING

Presentation av resultaten

Procentandelen celler med strukturella kromosomavvikelser bör utvärderas. Avvikelser av kromatid- och kromosomtyp som klassificeras enligt subtyper (brott, utbyten) bör anges separat, med antal och intervaller för försöks- och kontrollodlingarna. Luckor i DNA-strängen registreras och rapporteras separat, men inkluderas i allmänhet inte i den totala avvikelsefrekvensen. Andelen polyploidi och/eller endoreduplicerade celler rapporteras om de observeras.

Parallella mätningar av cytotoxicitet för alla behandlade samt negativa och positiva kontrollkulturer i huvudförsöken avseende avvikelser bör samlas in.

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

Kriterier för godkännande

Testet måste uppfylla följande kriterier för att godkännas:

- Den parallella negativa kontrollen måste anses godtagbar för registrering i laboratoriets historiska databas över negativa kontroller enligt punkt 39.
- Parallella positiva kontroller (se punkt 26) bör framkalla reaktioner som överensstämmer med de kontroller som genereras i en historiska databasen över positiva kontroller och ge en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.
- Cellproliferationskriterierna i lösningsmedelskontrollen bör vara uppfyllda (punkterna 17 och 18).
- Samtliga tre försöksbetingelser testades om inte ett gav positiva resultat (se punkt 28).
- Tillräckligt många celler och koncentrationer finns tillgängliga för analys (punkterna 31 och 21).
- Urvalskriterierna för toppkoncentrationen överensstämmer med de kriterier som beskrivs i punkterna 22, 23 och 24.

Utvärdering och tolkning av resultaten

Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart positiv om något av följande gäller för någon av de undersökta försöksbetingelserna (se punkt 28):

- a) Åtminstone en av testkoncentrationerna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med samtidig negativ kontroll.
- b) Ökningen är dosrelaterad när den utvärderas med ett lämpligt trendtest.
- c) Något av resultaten ligger utanför fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser, se punkt 39).

Om alla dessa kriterier är uppfyllda anses testkemikalien kunna inducera kromosomavvikelser hos odlade däggdjursceller i detta testsystem. Rekommendationer om de lämpligaste statistiska metoderna finns i litteraturen (49) (50) (51).

Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart negativ om följande gäller för samtliga undersökta försöksbetingelser (se punkt 28):

- a) Ingen av testkoncentrationerna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.

- b) Det finns ingen koncentrationsrelaterad ökning vid utvärdering med ett lämpligt trendtest.
- c) Alla resultat ligger inom fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser, se punkt 39).

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

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

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

I sällsynta fall är det inte möjligt att dra en slutsats om positiva eller negativa resultat trots ytterligare undersökningar, och i dessa fall anses den kemiska responsen vara tvetydig.

En ökning av antalet polyploida celler kan utgöra en indikation på att testkemikalien har potential att inhibera mitotiska processer och att inducera numeriska kromosomavvikelser (52). En ökning av antalet celler med endoreduplicerade kromosomer kan utgöra en indikation på att testkemikalierna har potential att inhibera cellcykelns förlopp (53) (54) (se punkt 2). Därför bör förekomsten av polyploida celler och celler med endoreduplicerade kromosomer registreras separat.

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

- Källa, satsnummer, sista förbrukningsdag om detta anges.
- Testkemikaliens stabilitet i sig, om den är känd.
- Löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet, om detta är känt.
- Mätning av pH, osmolalitet och utfällningar i det odlingsmedium till vilket testkemikalien tillsattes, i förekommande fall.

Monokomponentämne:

- fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,
- kemiska beteckningar, såsom IUPAC- eller CAS-beteckning, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturell formel, renhet, kemisk beteckning på föreningar i förekommande fall och om möjligt osv.

Multikomponentämne, UVCB och blandningar:

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

Lösningsmedel:

- Motivering av valet av lösningsmedel.
- Procentandelen lösningsmedel i den slutliga odlingsmediet ska också anges.

Celler:

- Typ av celler och deras källa.
- Den använda celltypens karyotypens egenskaper och lämplighet.
- Avsaknad av mykoplasma för cellinjer.
- För cellinjer, uppgifter om cellcykelns längd, fördubblingstid eller proliferationsindex.
- Blodgivarnas kön, ålder och annan relevant information om givarna, helblod eller separerade lymfocyter, använd mitogen substans.
- Antal passager för cellinjer om sådan information finns.
- Metoder för underhållet av cellodlingar för cellinjer.
- Det modala antalet kromosomer för cellinjer.

Testbetingelser:

- Identitet hos den kemikalie som stoppar celldelningen i metafasen, dess koncentration och cellexponeringens varaktighet.
- Testkemikaliens koncentration, uttryckt som slutlig koncentration i odlingsmediet (t.ex. µg eller mg/mL eller mM av odlingsmediet).
- Grund för val av koncentrationer och antalet kulturer inklusive t.ex. data för cytotoxicitet och löslighetsbegränsningar.
- Mediets sammansättning, CO₂-koncentration, om detta är tillämpligt, fuktighetsnivå.
- Koncentration (och/eller volym) av det lösningsmedel och den testkemikalie som tillsätts odlingsmediet.
- Inkubationstemperatur.
- Inkubationstid.
- Behandlingens varaktighet.
- Tidpunkten för skörd efter behandlingen.
- Celldensitet vid inokulering, om detta är tillämpligt.
- Typ och sammansättning hos det system som används för metabolisk aktivering (S9-källa, beredningsmetod för S9-blandningen, koncentration eller volym för S9-blandningen, S9 i det slutliga odlingsmediet, kvalitetskontroller av S9).
- Positiva och negativa kontrollkemikalier, slutkoncentrationer för varje behandlingsförhållande.
- Metoder för preparering av utstryksglas och färgningsteknik.
- Acceptanskriterier för försöken.
- Kriterier för hur avvikelser påvisas.
- Antal analyserade metafaser.
- Metoder för mätning av cytotoxicitet.
- All tilläggsinformation som är relevant rörande cytotoxicitet samt använd metod.
- Kriterier för att bedöma om testresultaten är positiva, negativa eller tvetydiga.
- Använda metoder för att bestämma pH, osmolalitet och utfällningar.

Resultat:

- Antal behandlade celler och antal skördade celler för varje odling om cellinjer används.
- Cytotoxiska mätningar, t.ex. RPD, RICC och MI samt eventuella andra iakttagelser.
- För cellinjer, uppgifter om cellcykelns längd, fördubblingstid eller proliferationsindex.
- Tecken på utfällning och tid för bestämningen.
- Definition av avvikelser, inklusive luckor i DNA-strängen.
- Antal klassificerade celler, antal celler med kromosomavvikelser och typ av sådana avvikelser, angivna separat för varje behandlad kultur samt kontrollodling, inklusive och exklusive luckor.
- Förändringar i ploiditet (polyploida celler och celler med endoreduplicerade kromosomer registreras separat) om sådana påvisas.
- Koncentration-responsförhållande, där det är möjligt.
- Data om parallella negativa (lösningsmedel) och positiva kontroller (koncentrationer och lösningsmedel).
- Historiska negativa (lösningsmedel) och positiva kontrolldata med intervall, medelvärden, standardavvikelser och 95 %-kontrollgränser för distribution samt antalet uppgifter.
- statistiska analyser, p-värden om sådana finns.

*Diskussion av resultaten.**Slutsatser.*

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) 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, s. 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, s. 427–432.
- (4) Galloway, S.M. m.fl. (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 10/suppl. 10, s. 1–175.
- (5) Muehlbauer, P.A.m.fl. (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, s. 318–327.
- (6) Kapitel B.49 i denna bilaga: Mikronukleustest av däggdjursceller *in vitro*.
- (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. m.fl. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, vol.257/2, s. 147–204.

-
- (9) Morita, T. m.fl. (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 268/2, s. 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, s. 789–886.
- (11) Lång, L.H. m.fl. (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, s. 177–183.
- (12) Nesslany, F. m.fl. (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 49/6, s. 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, s. 191–201.
- (14) Kirkland, D. m.fl. (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, s. 1–256.
- (15) Greenwood, S. m.fl. (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, s. 36–44.
- (16) Hilliard, C.A. m.fl. (1998), Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 31/4, s. 316–326.
- (17) Hedner K. m.fl. (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, vol. 62, s. 305–309.
- (18) Ramsey M.J. m.fl. (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, vol. 338, s. 95–106.
- (19) Coecke S. m.fl. (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, vol. 33/3, s. 261–287.
- (20) Henderson, L. m.fl. (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, vol.12/3, s.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, s. 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, s. 173–215.
- (23) Natarajan, A.T. m.fl. (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, s. 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, s. 277–290.
- (25) Ong, T.-m. m.fl. (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, s. 55–65.

- (26) Elliot B.M. m.fl. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, vol. 7/3, s. 175–177.
- (27) Matsushima, T. m.fl. (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. m.fl. (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, vol. 312/3, s. 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, s. 51–59.
- (30) Unep (2001), Stockholmskonventionen om långlivade organiska föroreningar, United Nations Environment Programme (Unep). Finns 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, s. 225–228.
- (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, s. 91–103.
- (33) Zamora, P.O. m.fl. (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, s. 795–801.
- (34) Asakura, M. m.fl. (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, vol. 652/2, s. 122–130.
- (35) Lorge, E. m.fl. (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, s. 1–3.
- (36) Galloway, S. m.fl. (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, s. 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, s. 86–87.
- (38) Richardson, C. m.fl. (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, s. 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 och 487) ENV/JM/TG(2014)17. Tillgänglig på begäran.
- (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, s. 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, s. 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/newchemicals/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. Finns 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. m.fl. (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. m.fl. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, vol. 723/2, s. 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. m.fl. (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 10/suppl. 10, s. 1–175.
 - (51) Richardson, C. m.fl. (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, s. 29–46.
 - (53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, vol. 119/3, s. 403–413.
 - (54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, vol. 43/3, s. 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, s. 139–149.
-

Tillägg 1

DEFINITIONER

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

Apoptos: programmerad celldöd som karakteriseras av en serie steg som leder till sönderfall av celler till membranbundna partiklar som därefter elimineras genom fagocytos eller avstötning.

Cellproliferation: ökning av antalet celler som resultat av mitotisk celledelning.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Kromatidbrott: diskontinuitet i en enstaka kromatid där det finns en tydlig missanpassning hos en av kromatiderna.

Kromatidlucka: ej färgat område (akromatisk skada) hos en enstaka kromatid där det finns en minimal missanpassning hos kromatiden.

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

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

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

Koncentrationer: slutliga koncentrationer av testkemikalien i odlingsmediet.

Cytotoxicitet: För försök med användning av cellinjer som omfattas av denna testmetod avser cytotoxicitet en minskning av den relativa populationsfördupplingen (RPD) eller en relativ ökning av celltal (RICC) i behandlade celler jämfört med den negativa kontrollen (se punkt 17 och tillägg 2). För försök med användning av primära odlingar av lymfocyter som omfattas av denna testmetod avser cytotoxicitet en minskning av det mitotiska indexet (MI) hos behandlade celler jämfört med den negativa kontrollen (se punkt 18 och tillägg 2).

Endoreduplikation: en process där kärnan efter en S-fas under DNA-replikationen inte övergår i mitos utan inleder ännu en S-fas. Resultatet är kromosomer med 4, 8, 16, ... kromatider.

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

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

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

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

Numerisk avvikelse: en förändring av antalet kromosomer jämfört med det normala antalet karakteristika hos de celler som används.

Polyploidi: numeriska kromosomavvikelser i celler eller organismer som inbegriper en eller flera hela kromosomuppsättningar, i motsats till en enskild kromosom eller kromosomer (aneuploidi).

p53-status: p53-proteinet är involverat i cellcykelreglering, apoptos och DNA-reparation. Celler som lider brist på funktionellt p53-protein och är oförmögna att stoppa cellcykeln eller eliminera skadade celler via apoptos eller andra mekanismer (t.ex. induktion av DNA-reparation) i samband med p53-funktioner till svar på en DNA-skada, bör teoretiskt sett vara mer benägna till genmutationer eller kromosomavvikelser.

Relativ ökning i celltal (RICC): ökning av antalet celler i kemiskt exponerade kulturer jämfört med ökningarna i icke-behandlade kulturer, ett förhållande uttryckt i procent.

Relativ populationsfördubbling (RPD): ökning av antalet populationsfördubblingar i kemiskt exponerade kulturer jämfört med ökningen i icke-behandlade kulturer, ett förhållande uttryckt i procent.

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

S9-blandning: blandning av S9-leverfraktion och kofaktorer som krävs för metaboliska enzyms aktivitet.

Lösningsmedelskontroll: Allmän term för att definiera kontrollodlingar där endast lösningsmedel används för att lösa upp testkemikalien.

Strukturell avvikelse: en förändring i kromosomstrukturen som kan detekteras genom en mikroskopisk undersökning av celldelningens metafasstadium, och som uppträder i form av deletioner och fragment, interna eller externa utbyten.

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

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

Tillägg 2.

FORMLER FÖR BESTÄMNING AV CYTOTOXICITET

Mitotiskt index (MI):

$$\text{MI}(\%) = \frac{\text{antal mitotiska celler}}{\text{totalt antal räknade celler}} \times 100$$

Relativ ökning av celltal (RICC) eller relativ populationsfördubbling (RPD) rekommenderas, eftersom den andel av cellpopulationen som har delat sig beaktas i båda metoderna.

$$\text{RICC}(\%) = \frac{(\text{ökning av antalet celler i behandlade kulturer}(\text{slutligt-initialt}))}{(\text{ökning av antalet celler i kontrollkulturer}(\text{slutligt-initialt}))} \times 100$$

$$\text{RPD}(\%) = \frac{(\text{antal populationsfördubblingar i behandlade kulturer})}{(\text{antal populationsfördubblingar i kontrollkulturer})} \times 100$$

där

Populationsfördubbling: $[\log (\text{Cellantal efter behandling} \div \text{Ursprungligt cellantal})] \div \log 2$

En RICC eller en RPD på 53 % indikerar t.ex. 47 % cytotoxicitet/cytostas, och 55 % cytotoxicitet/cytostas mätt med MI innebär att det faktiska MI är 45 % av kontrollen.

I alla händelser bör antalet celler före behandling mätas, vilket även gäller behandlade och negativa kontrollodlingar.

Tidigare användes RCC (dvs. antalet celler i behandlade kulturer/antalet celler i kontrollkulturer) som cytotoxicitetsparameter, men rekommenderas inte längre eftersom cytotoxiciteten kan underskattas enligt detta mått.

I negativa kontrollkulturer bör populationsfördubblingstiden överensstämja med kravet på provtagning av celler efter behandling vid en tidpunkt som motsvarar cirka 1,5 gånger den normala cellcykelns längd. Det mitotiska indexet bör vara tillräckligt högt för att få ett tillräckligt antal celler i mitos och tillförlitligt beräkna en minskning med 50 %."

(4) I del B ska kapitel B.11 ersättas med följande:

"B.11 Test av kromosomavvikelser i benmärg hos däggdjur**INLEDNING**

Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje 475 (2016). Det är en del av en serie av testmetoder för genetisk toxikologi. Ett OECD-dokument som ger kortfattad information om tester inom genetisk toxikologi och en översikt över de senaste ändringarna av dessa testriktlinjer har utarbetats (1).

Tester av kromosomavvikelser i benmärg hos däggdjur är särskilt relevanta för att bedöma gentoxicitet, eftersom faktorer rörande in vivo-metabolism, farmakokinetik och DNA-reparationsprocesser är aktiva och bidrar till responsen, även om de varierar mellan arterna. Ett test in vivo är även användbart för fortsatta undersökningar av gentoxicitet, med detektion i ett in vitro-system.

Testet in vivo av kromosomavvikelser hos däggdjur används för att detektera strukturella kromosomavvikelser inducerade av testkemikalier i benmärgsceller hos djur, vanligen hos gnagare (2) (3) (4) (5). Strukturella kromosomavvikelser kan vara av två typer, kromosomala eller kromatida. Huvuddelen av de gentoxiska kemikalieinducerade avvikelserna är av kromatidtyp, men även avvikelser av kromosomtyp förekommer. Kromosomskada och liknande händelser är orsaken till många genetiska sjukdomar hos människa och det finns omfattande bevis för att sådana skador och liknande händelser, när de ger upphov till förändringar i onkogener och tumorsuppressorgener, är inblandade i cancer hos människa och i experimentella system. Polyploidi (inklusive endoreduplicering) kan uppstå vid tester av kromosomavvikelser in vivo. En ökning av polyploidi tyder inte i sig på aneugener, och kan helt enkelt tyda på störningar i cellcykeln eller cytotoxicitet. Detta test är inte utformat för att mäta aneuploidi. Mikrokärntest in vivo av erythrocyter hos däggdjur (kapitel B.12 i denna bilaga) och däggdjurmikrokärntest in vivo av erythrocyter (kapitel B.49) i denna bilaga är det in vivo- respektive in vitro-test som rekommenderas för detektion av aneuploidi.

Definitioner av använd terminologi anges i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

Gnagare används rutinmässigt i detta test, men även andra arter kan vara lämpliga i vissa fall om det är vetenskapligt motiverat. Benmärg är målvävnaden i detta test, eftersom det är en mycket kärlik vävnad som innehåller en cellpopulation med en snabb cellcykel, och där cellerna enkelt kan isoleras och bearbetas. Om andra arter än råttor och möss används bör en vetenskaplig motivering lämnas i rapporten. Om andra arter än gnagare används bör mätningen av kromosomavvikelser i benmärg integreras i ett annat lämpligt toxicitetstest.

Om det finns bevis för att testkemikalien eller dess metaboliter inte kommer att nå målvävnaden kan detta test vara olämpligt att använda.

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

TESTMETODENS PRINCIP

Försöksdjuren exponeras för testkemikalien genom en lämplig exponeringsväg och avlivas sedan humant vid en lämplig tid efter behandlingen. Innan de avlivas behandlas djuren med ett ämne som gör att celler stannar upp i metafase (t.ex. colchicin eller colcemid). Kromosombredningar görs sedan från benmärgscellerna och färgas in, varpå celler i metafase analyseras med avseende på kromosomavvikelser.

KONTROLL AV LABORATORIEKOMPETENS

Kompetensundersökningar

För att fastställa att det finns tillräcklig erfarenhet av testet innan det används för rutintestning bör laboratoriet visa sin förmåga att reproducera förväntade resultat från publicerade data (för kromosomavvikelser (6) t.ex. frekvenser med minst två positiva kontrollkemikalier (inklusive svag respons inducerad av låga doser av positiva kontroller) enligt tabell 1 och med förenliga vehikel-/lösningsmedelskontroller (se punkt 22). I försöken bör man använda doser som ger reproducerbara och dosrelaterade ökningar och visar testsystemets sensitivitet och dynamiska omfång när det gäller den berörda vävnaden (benmärg), med användning av den klassificeringsmetod som laboratoriet tillämpar. Detta gäller inte laboratorier som redan har erfarenhet, dvs. har en historisk databas enligt punkterna 10–

Historiska kontrolldata

Laboratoriet bör fastställa följande i kompetenundersökningarna:

- Ett historiskt positivt kontrollintervall och fördelning.
- Ett historiskt negativt kontrollintervall och fördelning.

Om data för en historisk negativ kontrollfördelning samlas in först bör de parallella negativa kontrollerna överensstämma med publicerade kontrolldata om sådana finns. Allteftersom den historiska kontrollfördelningen kompletteras med fler försöksdata bör de parallella negativa kontrollerna i idealfallet ligga inom fördelningens kontrollgräns på 95 %. Laboratoriets historiska negativa kontrolldatabas bör vara statistiskt robust för att säkerställa laboratoriets förmåga att bedöma fördelningen av negativa kontrolldata. Enligt litteraturen kan minst 10 försök behövas, men databasen bör helst bestå av minst 20 försök utförda under jämförbara försöksbetingelser. Laboratorierna bör använda kvalitetskontrollmetoder såsom kontrolldiagram (t.ex. C-diagram eller X-stapelldiagram (7)), för att fastställa hur variabla deras data är och för att visa att metoden är "under kontroll". Fler rekommendationer om hur man bygger upp och använder historiska kontrolldatabaser (t.ex. kriterier för att innefatta och utesluta data samt acceptanskriterier för ett givet försök) finns i litteraturen (8).

Om laboratoriet inte slutför ett tillräckligt antal försök för att fastställa en statistiskt robust negativ kontrollfördelning (se punkt 11) under kompetensundersökningarna (beskrivs i punkt 9) kan fördelningen byggas upp under de första rutintesterna. Denna strategi bör följa rekommendationerna i litteraturen (8) och de negativa kontrollresultat som erhållits i dessa experiment bör överensstämma med publicerade negativa kontrolldata.

Eventuella ändringar av försöksprotokollen bör övervägas för att se till att resulterande data fortfarande överensstämmer med laboratoriets befintliga historiska kontrolldatabas. Endast stora inkonsekvenser bör leda till upprättandet av en ny historisk kontrolldatabas om en fackgranskning fastslår att den skiljer sig från den föregående fördelningen (se punkt 11). Om en ny databas byggs upp kanske inte en fullständig negativ kontrolldatabas behövs för att utföra ett faktiskt test, under förutsättning att laboratoriet kan visa att dess parallella negativa kontrollvärden fortfarande överensstämmer med den tidigare databasen eller motsvarande publicerade data.

Negativa kontrolldata bör bestå av förekomsten av strukturella kromosomavvikelser (exklusive luckor) hos varje djur. Parallella negativa kontroller bör helst ligga inom kontrollgränsen på 95 % för fördelningen av laboratoriets historiska negativa kontrolldatabas. Om parallella negativa kontrolldata faller utanför kontrollgränserna på 95 % kan de ändå ingå i den historiska kontrollfördelningen så länge de inte är extremt avvikande och det finns bevis för att testsystemet är under kontroll (se punkt 11) och att inga tekniska eller mänskliga fel begåtts.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Förberedelser

Val av djurart

Unga och friska vuxna exemplar som härrör från normala laboratoriestammar. Oftast används råttor, men även möss kan vara lämpliga. Andra lämpliga däggdjursarter kan användas om en vetenskaplig motivering anges i rapporten.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

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

Förberedelse av djuren

Normalt används friska unga vuxna djur (6–10 veckor gamla vid behandlingsstarten, även om något äldre djur också är godtagbara) som slumpvis väljs ut till kontroll- och behandlingsgrupperna. Djuren ska ha en unik identifiering som appliceras med en human och minimalt invasiv metod (t.ex. ringmärkning, taggar, mikrochip eller biometrisk identifiering, men inte öron- eller tassclips). De bör vänjas vid förhållandena i laboratoriet under minst fem dagar. Burarna bör placeras så att eventuella verkningar på grund av placeringen minimeras. Korskontaminering av den positiva kontrollen och testkemikalien bör undvikas. Vid undersökningens början bör viktskillnaderna mellan försöksdjuren vara minimal och inte överskrida $\pm$ 20 % av medelvikten för varje kön.

Beredning av doser

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

Lösningsmedel/vehikel

Lösningsmedlet/vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testkemikalien. Om andra lösningsmedel/vehiklar än väl kända används bör det finnas referensdata som visar att de är kompatibla. När det är möjligt, rekommenderas att man i första hand överväger vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar. Exempel på vanliga kompatibla lösningsmedel/vehiklar är vatten, fysiologisk saltlösning, metylcellulosalösning, karboximetylcellulosa natriumsaltlösning, olivolja och majsolja. I avsaknad av historiska eller publicerade kontrolldata som visar att inga strukturella avvikelser eller andra skadliga effekter induceras av det valda lösningsmedlet/vehikeln bör en preliminär undersökning utföras för att fastställa acceptansen för vehikelkontrollen.

Kontroller

Positiva kontroller

En grupp djur som behandlas med en positiv kontrollkemikalie bör normalt ingå i varje test. Denna regel kan frångås om testlaboratoriet har visat att det är kvalificerat att utföra testet och har fastställt ett historiskt positivt kontrollintervall. Om en parallell positiv kontrollgrupp inte ingår bör klassificeringskontroller (fasta och ofläckade utstryksglas) inkluderas i varje försök. Detta kan åstadkommas genom att inbegripa lämpliga referensprover i klassificeringen av undersökningen som har erhållits och lagrats från ett separat positivt kontrollförsök som utförs med jämna mellanrum (tex var 6:e till 18 månad) på det laboratorium där testet utförs, t.ex. under kvalifikationsprövning och vid behov med jämna mellanrum därefter.

Positiva kontrollkemikalier bör på ett tillförlitligt sätt ge en detekterbar ökning i frekvensen av celler med strukturella kromosomavvikelser över den spontana nivån. Positiva kontroldoser bör väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga men inte omedelbart avslöjar identiteten hos de kodade proverna för bedömaren. Det är acceptabelt att den positiva kontrollen administreras via en annan tillförselväg än testkemikalien och enligt ett annat behandlingsschema, och att provtagningen endast sker vid ett tillfälle. Dessutom kan användningen av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier övervägas i förekommande fall. Exempel på positiva kontrollkemikalier ges i tabell 1.

Tabell 1

Exempel på positiva kontrollkemikalier

Kemikalie	CASRN
Etylmetansulfonat	62-50-0
Metylmetsulfonat	66-27-3
Etylnitrosourea	759-73-9
Mitomycin C	50-07-7
Cyklofosamid (monohydrat)	50-18-0 (6055-19-2)
Trietylenmelamin	51-18-3

Negativa kontroller

Djur från den negativa kontrollgruppen bör inkluderas vid varje provtagningstillfälle och i övrigt hanteras på samma sätt som behandlingsgrupperna, med undantag för att de inte behandlas med testkemikalien. Om lösningsmedel/vehikel används för att tillföra testkemikalien bör kontrollgruppen tillföras lösningsmedlet/vehikeln. Om testlaboratoriet påvisar enhetliga variationer mellan djur och frekvenser av celler med strukturella avvikelser genom historiska negativa kontrolldata vid varje provtagningstillfälle kan det dock vara tillräckligt med en enda provtagning för den negativa kontrollen. Om en enda provtagning används för negativa kontroller bör den vara det första provtagningstillfället i undersökningen.

FÖRFARANDET

Djurens antal och kön

I regel är responsen när det gäller mikrokärnor liknande mellan han- och hondjur (9), och detta förväntas även gälla strukturella kromosomavvikelser. De flesta försök kan därför utföras på båda könen. Om det finns data som visar på relevanta skillnader mellan hanar och honor (t.ex. skillnader i systemisk toxicitet, metabolism, biotillgänglighet, benmärgstoxicitet osv., inklusive ett preliminärt test) bör båda könen användas. I detta fall kan det vara lämpligt att göra en undersökning av båda könen, t.ex. som en del av en upprepad dostoicitetsundersökning. Om båda könen används kan ett faktorförsök vara lämpligt. En närmare beskrivning av hur man analyserar data med användning av faktorförsök ges i tillägg 2.

Gruppernas storlek vid försöksstarten bör fastställas. Målet bör vara minst fem analyserbara djur av ett kön, eller av varje kön om båda könen används, per grupp. I de fall där exponering av människa för kemikalier kan ge könsspecifika resultat, som t.ex. för vissa läkemedel, bör testet utföras med försöksdjur av lämpligt kön. Som en vägledning för ett vanligt krav på maximalt antal djur skulle det krävas 45 djur för en benmärgsundersökning med två provtagningstillfällen, tre dosgrupper och en parallell negativ kontrollgrupp plus en positiv kontrollgrupp (fem djur av ett kön i varje grupp).

Dosnivåer

Om det inte redan finns lämpliga data som kan ge vägledning om dosval och en preliminär undersökning därför utförs för att fastställa omfattningen, bör denna undersökning utföras i samma laboratorium, och med samma arter, stammar, kön och behandlingsschema som senare ska användas i huvudundersökningen (10). Syftet med undersökningen bör vara att identifiera högsta tolererbara dos (MTD), som definieras som den dos som tolereras utan bevis för toxicitet som begränsar undersökningen i förhållande till dess varaktighet (t.ex. genom att inducera minskad kroppsvikt eller hematopoietisk systemcytotoxicitet, men inte dödlighet eller tecken på smärta, lidande eller ångest som kräver human avlivning (11)).

Den högsta dosen kan även definieras som en dos vilken producerar en indikation på toxicitet för benmärgen.

Kemikalier som uppvisar mättnad av toxikokinetiska egenskaper eller inducerar avgiftningsprocesser som kan leda till minskad exponering efter långtidsbehandling kan vara undantag från kriterierna för dosbestämning och bör utvärderas från fall till fall.

För att inhämta data om dosrespons bör en fullständig undersökning omfatta en negativ kontrollgrupp och minst tre dosnivåer som vanligen separeras av en faktor på 2, men inte högre än 4. Om testkemikalien inte visar toxicitet i en preliminär undersökning eller baserat på befintliga uppgifter bör den högsta dosen för engångsdosering vara 2 000 mg/kg kroppsvikt. Om testkemikalien orsakar toxicitet bör MTD vara den högsta dosen och de dosnivåer som används bör helst omfatta ett intervall från maxdos till en dos som producerar liten eller ingen toxicitet. När toxicitet i målvävnaden (benmärg) observeras vid alla testade dosnivåer rekommenderas fortsatta undersökningar med icke-toxiska doser. Undersökningar som syftar till att mer grundligt karakterisera kvantitativ information om dosrespons kan kräva ytterligare dosgrupper. Dessa gränser kan variera för vissa typer av testkemikalier (t.ex. humanläkemedel) som omfattas av särskilda krav.

Toleranstest

Om försök för att fastställa dosering eller befintliga data från besläktade djurstammar tyder på att ett behandlingssystem med minst gränsdosen (beskrivs nedan) inte ger några observerbara toxiska effekter (ingen minskning av benmärgens proliferation eller andra bevis på cytotoxicitet i målvävnaden), och om ingen gentoxicitet förväntas baserat på in vitro-undersökningar av gentoxicitet eller data från strukturellt besläktade kemikalier, anses det kanske inte nödvändigt med ett fullständigt test med tre dosnivåer, under förutsättning att det har påvisats att testkemikalien når målvävnaden (benmärg). I sådana fall kan en enda dosnivå, vid gränsdosen, vara tillräcklig. För en administrationsperiod på > 14 dagar är gränsdosen 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag. För administrationsperioder på 14 dagar eller mindre är gränsdosen 2 000 mg/kg/kroppsvikt/dag.

Tillförsel av doser

Den förväntade exponeringsvägen för människor bör beaktas vid utformningen av en analys. Därför kan exponeringsvägar (t.ex. föda, dricksvatten, lokalt, subkutant, intravenöst, oralt (via sond), inhalation, intratrakealt eller implantation) väljas som motiverad exponering. Exponeringsvägen bör i alla händelser väljas för att säkerställa lämplig exponering av målvävnaden. Intraperitoneal injektion rekommenderas generellt inte eftersom den inte är en avsedd exponeringsväg för människor, och bör endast användas med specifik vetenskaplig motivering. Om testkemikalien blandas i födan eller dricksvattnet bör man, särskilt i fråga om engångsdosering, se till att fördröjningen mellan födo- och vattenintag och provtagning är tillräcklig för att upptäcka effekterna (se punkterna 33–34). Den maximala vätskevolymen som kan administreras genom sondmatning eller injektion vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör normalt inte överstiga 1 ml per 100 g kroppsvikt, utom för vattenlösningar där högst 2 ml/100 g får användas. Användning av volymer som är större än så bör motiveras. Med undantag för irriterande eller frätande testkemikalier, som normalt kommer att ge stegrade verkningar vid högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom justering av koncentrationen för att säkerställa att en konstant volym ges i förhållande till kroppsvikten vid alla dosnivåer.

Behandlingsschema

Testkemikalierna ges normalt som en enstaka behandling, men kan även ges som en delad dos (dvs två eller flera behandlingar samma dag med högst 2–3 timmars mellanrum) för att underlätta tillförsel av stora volymer. Under dessa omständigheter eller när tillförseln av testkemikalien sker via inhalation bör provtagningstiden planeras baserat på tidpunkten för den sista doseringen eller när exponeringen upphör.

Det finns få uppgifter om huruvida ett protokoll med upprepade doser är lämpligt för detta test. Under omständigheter där det är önskvärt att integrera detta test med ett toxicitetstest med upprepade doser bör man dock vara noga med att undvika förlust av mitotiska celler med kromosomskador, som kan förekomma vid toxiska doser. Integrering är godtagbar när den högsta dosen är större eller motsvarar gränsdosen (se punkt 29) och en dosgrupp ges som gränsdos under behandlingsperiodens varaktighet. Mikrokärntest (testmetod B.12) bör vara det in vivo-test som väljs för kromosomavvikelse när integrering med andra undersökningar är önskvärt.

Benmärgsprov bör tas vid två separata tillfällen efter enstaka behandlingar. För gnagare bör det första provtagningsintervallet vara den tid som krävs för att slutföra 1,5 normala cellcykellängder (normalt 12–18 timmar efter behandlingsperioden). Eftersom den tid som krävs för upptag och metabolism av testkemikalien och dess effekt på cellcykelns kinetik kan påverka den optimala tiden för detektion av kromosomavvikelse, rekommenderas att provtagningen senareläggs till 24 timmar efter det första provtagningstillfället. Vid det första provtagningstillfället bör alla dosgrupper behandlas och prover samlas in för analys. Vid senare provtagningstillfällen behöver endast den högsta dosen ges. Om doseringar på mer än en dag används baserat på en vetenskaplig motivering bör man ha ett provtagningstillfälle vid upp till cirka 1,5 gånger den normala cellcykelns längd efter den slutliga behandlingen.

Efter behandling och före provtagning injiceras försöksdjuren intraperitonealt med en lämplig dos av ett metafashämmande medel (t.ex. colcemid eller colchicin), och prover samlas in vid ett lämpligt intervall därefter. För möss är detta intervall ungefär 3–5 timmar före insamlingen och för råttor 2–5 timmar. Celler skördas från benmärgen, svullna, fixerade och färgade, och analyseras med avseende på kromosomavvikelse (12).

Observationer

Allmänna kliniska observationer av testdjuren bör göras och kliniska tecken registreras minst en gång per dag, helst vid samma tidpunkt med hänsyn till maximalt förväntade effekter efter doseringen. Djuren bör observeras minst två gånger dagligen under doseringsperioden beträffande morbiditet och mortalitet. Alla djur bör vägas när undersökningen inleds, åtminstone en gång i veckan under undersökningar med upprepad dosering och vid avlivning. För undersökningar som varar minst en vecka bör mätning av foderkonsumtion göras minst en gång i veckan. Om testkemikalien tillförs via dricksvattnet bör även vattenkonsumtionen mätas vid varje byte av vatten och minst en gång i veckan. Djur som uppvisar icke-dödliga indikatorer på överskottstoxicitet bör avlivas på ett humant sätt innan testperiodens slut (11).

Exponering av målvävnaden

Blodprov tas vid lämpliga tidpunkter för att möjliggöra undersökningar av testkemikaliens plasmanivåer. Syftet med detta är att visa att benmärgen har exponerats om så krävs och om det inte finns andra exponeringsdata (se punkt 44).

Benmärg och kromosompreparat

Omedelbart efter det att djuren avlivats humant tas benmärgsceller från djurens lår- eller skenben, exponeras för hypoton lösning och fixeras. Metafascellerna sprids sedan ut på utstryksglas och färgas med användning av etablerade metoder (se (3) (12)).

Analys

Alla utstryksglas, inklusive utstryksglas med positiva och negativa kontroller, bör ges en oberoende kodning före analysen och bör randomiseras så att bedömare inte känner till behandlingsbetingelserna.

Det mitotiska indexet bör fastställas som ett mått på cytotoxicitet hos minst 1 000 celler per djur för alla behandlade försöksdjur (inklusive positiva kontroller), obehandlade försöksdjur eller djur för negativ kontroll med vehikel/lösningsmedel.

Minst 200 metafaser bör analyseras för varje djur med avseende på strukturella kromosomavvikelser, inklusive och exklusive luckor (6). Om den historiska databasen över negativa kontroller visar att bakgrundsmedelvärdet för frekvensen för strukturella kromosomavvikelser är < 1 % på testlaboratoriet bör man överväga att klassificera ytterligare celler. Avvikelser av kromatid- och kromosomtyp bör registreras separat och klassificeras enligt subtyper (brott, utbyten). Laboratoriets förfaranden ska säkerställa att analysen av kromosomavvikelser utförs av välutbildade bedömare och fackgranskas vid behov. Eftersom beredningen av utstryksglas ofta resulterar i brott på en del av de celler som är i metafas med förlust av kromosomer som följd, bör de celler som påträffas därför innehålla ett centromerantal på minst $2n \pm 2$, där n är antalet haploider för kromosomerna hos den arten.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

Individuella djurdata bör presenteras i tabellform. Mitotiskt index, antalet metafasceller som påträffas, antalet avvikelser per metafascell och procentandelen celler med strukturella kromosomavvikelse utvärderas för varje djur. Olika typer av strukturella kromosomavvikelse bör listas med antal och frekvenser för behandlade grupper och kontrollgrupper. Luckor samt polyploida celler och celler med endoreduplicerade kromosomer registreras separat. Frekvensen av luckor rapporteras men tas i regel inte med i analysen av den totala strukturella avvikelsefrekvensen. Om det inte finns några bevis för en skillnad i resultaten mellan könen, kan data kombineras för statistisk analys. Uppgifter om toxicitet för djur och kliniska tecken bör också rapporteras.

Kriterier för godkännande

Följande kriterier avgör om testet är godtagbart:

- a) Parallella negativa kontrolldata anses godtagbara för registrering i laboratoriets historiska databas (se punkterna 11–14).
- b) Parallella positiva kontroller eller klassificeringskontroller bör framkalla reaktioner som överensstämmer med de kontroller som genereras i den historiska databasen över positiva kontroller och ge en statistiskt signifikant ökning jämfört med den negativa kontrollen (se punkterna 20–21).
- c) Ett lämpligt antal doser och celler har analyserats.
- d) Urvalskriterierna för högsta dos överensstämmer med de kriterier som beskrivs i punkterna 25–28.

Utvärdering och tolkning av resultaten

Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart positiv om följande gäller:

- a) Åtminstone en av behandlingsgrupperna uppvisar en statistiskt signifikant ökning av frekvensen av celler med strukturella kromosomavvikelse (exklusive luckor) jämfört med den parallella negativa kontrollen.
- b) Ökningen är dosrelaterad vid minst ett provtagningstillfälle när den utvärderas med ett lämpligt trendtest.
- c) Något av resultaten ligger utanför fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser).

Om endast den högsta dosen undersöks vid ett visst provtagningstillfälle anses en testkemikalie vara klart positiv om det finns en statistiskt säkerställd ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen och resultaten ligger utanför fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser). Rekommendationer om lämpliga statistiska metoder finns i litteraturen (13). Om en dos-responsanalys genomförs bör minst tre behandlade dosgrupper analyseras. Statistiska tester som används bör betrakta djuret som den experimentella enheten. Positiva resultat i testet av kromosomavvikelse visar att testkemikalien inducerar strukturella kromosomavvikelse i benmärgen hos de arter som testades.

Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart negativ om följande gäller för samtliga undersökta försöksbetingelser:

- a) Ingen av behandlingsgrupperna uppvisar en statistiskt signifikant ökning av frekvensen av celler med strukturella kromosomavvikelse (exklusive luckor) jämfört med den parallella negativa kontrollen.

- b) Ingen dosrelaterad ökning förekommer vid något provtagningstillfälle vid utvärdering med ett lämpligt trendtest.
- c) Alla resultat ligger inom fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser.
- d) Benmärgen exponerades för testkemikalien.

Rekommendationer om de lämpligaste statistiska metoderna finns i litteraturen (13). Bevis för att benmärgen exponerats för en testkemikalie kan vara en minskning av det mitotiska indexet eller mätningar av plasma- och blodnivåerna i förhållande till testkemikalien. Vid intravenös tillförsel behövs inga bevis på exponering. Alternativt kan ADME-data, som erhållits i en oberoende undersökning med samma exponeringsväg och samma arter, användas för att visa benmärgsexponering. Negativa resultat indikerar att testkemikalien, under dessa försöksbetingelser, inte inducerar strukturella kromosomavvikelser i benmärgen hos de arter som testades.

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

Om responsen varken är klart negativ eller klart positiv och för att göra det lättare att fastställa resultatets biologiska relevans (t.ex. en svag ökning eller en ökning som ligger på gränsen) bör de försök som slutförts fackgranskas och/eller undersökas ytterligare. I vissa fall kan analys av fler celler eller ett upprepat försök med modifierade försöksbetingelser vara användbart.

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

Frekvenserna av polyploida och endoreduplicerade metafaser bland det totala antalet metafaser bör registreras separat. En ökning av antalet polyploida/endoreduplicerade celler kan utgöra en indikation på att testkemikalierna har potential att inhibera mitotiska processer eller cellcykelns förlopp (se punkt 3).

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande information:

Sammanfattning

Testkemikalie:

- Källa, satsnummer, sista förbrukningsdag om detta anges.
- Testkemikalien stabilitet, om den är känd.

Monokomponentämne:

- fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,
- kemiska beteckningar, såsom IUPAC- eller CAS-beteckning, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturell formel, renhet, kemisk beteckning på föreningar i förekommande fall och om möjligt osv.

Multikomponentämne, UVCB och blandningar:

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

Beredning av testkemikalien:

- Motivering för val av vehikel.
- Löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt.
- Beredning av foder-, dricksvatten- eller inandningsberedningar.
- Analytiska bestämningar av beredningar (t.ex. stabilitet, homogenitet, nominella koncentrationer, om sådana bereds).

Försöksdjur:

- Art/stam som används och motivering av valet.
- Djurens antal, ålder och kön.
- Ursprung, inhysning, foder etc.
- Metod för unik identifiering av djuren.
- För korttidsstudier: individuell vikt hos försöksdjuren vid försökets början och slutet av testet; för studier längre än en vecka: individuella kroppsvikter under studien och foderförbrukning. Kroppsviktsintervallet, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp bör inkluderas.

Testbetingelser:

- Positiva och negativa kontroller (vehikel/lösningsmedel).
- Data från en dosfinnande studie, om en sådan har utförts.
- Grund för valet av dosnivå.
- Uppgifter om beredning av testkemikalien.
- Uppgifter om administreringen av testkemikalien.
- Grund för administreringssätt och varaktighet.
- Metoder för att verifiera att testkemikalien nådde det stora kretsloppet eller benmärgen.
- Faktisk dos (mg/kg kroppsvikt/dag) som beräknats genom födans/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (ppm) och konsumtion, i tillämpliga fall.
- Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.
- Metod för avlivning.
- Smärtlindringsmetod (i förekommande fall).
- Detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman samt motivering av valen.
- Metoder för preparation av utstryksglas.
- Metoder för mätningar av toxicitet.
- Identitet för den metafashämmande kemikalien, koncentration, dos och tidpunkt för tillförsel före provtagning.
- Förfaranden för att isolera och bevara prover.
- Kriterier för hur avvikelser påvisas.

- Antal analyserade metafasceller per djur och antal analyserade celler för bestämning av mitotiskt index.
- Acceptanskriterier för undersökningen.
- Kriterier för att bedöma om undersökningarna är positiva, negativa eller ofullständiga.

Resultat:

- Djurens skick före och under hela testperioden, inklusive tecken på toxicitet.
- Mitotiskt index, angivet separat för varje djur.
- Typ och antal avvikelser och avvikande celler, angivna separat för varje djur.
- Totalt antal avvikelser per grupp med medelvärden och standardavvikelser.
- Antal celler med avvikelser per grupp med medelvärden och standardavvikelser.
- Förändringar i ploiditet om sådana påvisas, inklusive frekvenser för polyploida och/eller endoreduplicerade celler.
- Dos/respons-förhållandet, där detta är möjligt.
- De statistiska analyser och metoder som använts.
- Uppgifter som styrker att exponering av benmärgen skedde.
- Parallella negativa och positiva kontrolldata, med omfattning, medelvärden och standardavvikelser.
- Historiska negativa och positiva kontrolldata med intervall, medelvärden, standardavvikelser och 95 % kontrollgränser för distribution, den tidsperiod som omfattas och antalet observationer.
- Kriterier som uppfyllts för positiv eller negativ respons.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser

Litteraturhänvisningar

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. m.fl. (1987), Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, vol. 189/2, s. 157–165.
- (4) Richold, M. m.fl. (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. m.fl. (1994), Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, vol. 312/3, s. 305–312.

-
- (6) Adler, I.D. m.fl. (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, s. 19–30.
- (7) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- (8) Hayashi, M. m.fl. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, vol. 723/2, s. 87–90.
- (9) Hayashi, M. m.fl. (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, vol. 312/3, s. 293–304.
- (10) Fielder, R.J. m.fl. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, vol. 7/5, s. 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, s. 147–163.
- (13) Lovell, D.P. m.fl. (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.
-

Tillägg 1

DEFINITIONER

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

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

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

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

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

Endoreduplikation: en process där kärnan efter en S-fas under DNA-replikationen inte övergår i mitos utan inleder ännu en S-fas. Resultatet är kromosomer med 4,8,16,... kromatider.

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

Mitotiskt index: förhållandet mellan antalet celler i mitos och det totala antalet celler i en population, vilket är ett mått på cellpopulationens proliferationsstatus.

Numerisk avvikelse: en förändring av antalet kromosomer från det normala antalet karakteristiskt för det försöksdjur som används (aneuploidi).

Polyploidi: en numerisk kromosomavvikelse med en ändring av kromosomuppsättningens antal, jämfört med en numerisk ändring i en del av kromosomuppsättningen (jfr aneuploidi).

Strukturell kromosomavvikelse: en förändring i kromosomstrukturen som kan detekteras genom en mikroskopisk undersökning av celldelningens metafasstadium, och som uppträder i form av deletioner och fragment, interna eller externa utbyten.

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

*Tillägg 2***UTFORMNING AV FAKTORFÖRSÖK FÖR IDENTIFIERING AV SKILLNADER MELLAN KÖNEN
I IN VIVO-TEST MED AVSEENDE PÅ KROMOSOMAVVIKELSER****Utformning och analys av faktorförsök**

I denna utformning testas minst fem hanar och fem honor vid varje koncentrationsnivå, vilket innebär att minst 40 djur måste användas (20 hanar och 20 honor plus relevanta positiva kontroller).

Detta är ett av de enklaste faktorförsöken och det motsvarar en tvåvägs-variationsanalys med kön och koncentrationsnivå som huvudsakliga effekter. Data kan analyseras med hjälp av många vanliga statistiska programvarupaket såsom SPSS, SAS, STATA, Genstat samt med hjälp av R.

Analysen delar upp variationen i datauppsättningen mellan kön, koncentrationer och interaktionen mellan kön och koncentrationer. Var och en av termerna testas mot en uppskattning av variationerna mellan replikatdjuren inom djurgrupper av samma kön som ges samma koncentration. Fullständig information om den underliggande metoden finns i många statistiska läroböcker (se litteraturhänvisningar) och i hjälpavsnitt i statistiska paket.

Nästa steg i analysen är att kontrollera interaktionstermen "kön x koncentration" i ANOVA tabellen ⁽¹⁾. I avsaknad av en signifikant interaktionsterm ger de kombinerade värdena mellan könen eller koncentrationsnivåerna giltiga statistiska test mellan nivåerna, baserat på den sammanslagna inomgruppsvariationen enligt ANOVA.

Nästa steg i analysen är att dela upp uppskattningen av variationen mellan koncentrationerna i kontraster, som möjliggör ett test avseende linjära och kvadratiske kontraster i responsen mellan koncentrationsnivåerna. Om en signifikant variation i kön x koncentration förekommer kan även denna term delas upp i interaktionskontraster enligt följande: linjära kontraster x kön och kvadratiske kontraster x kön. Med hjälp av dessa termer kan man testa om koncentrationsresponsen är parallell för de två könen eller om den skiljer sig åt.

Uppskattningen av den sammanslagna inomgruppsvariationen kan användas för parvisa test av skillnaderna mellan medelvärdena. Dessa jämförelser kan göras mellan medelvärdena för könen och medelvärdena för de olika koncentrationsnivåerna, t.ex. för jämförelser med de negativa kontrollnivåerna. Om det finns en signifikant interaktion kan man jämföra medelvärden för olika koncentrationer för samma kön eller medelvärden för båda könen vid samma koncentration.

Litteraturhänvisningar

Teori, utformning, metod, analys och tolkning av faktorförsök diskuteras i många statistiska läroböcker, från den enklaste tvåfaktorsanalysen till mer komplexa former som används i försöksutformningsmetoder. Följande förteckning är icke-uttömmande: Vissa böcker innehåller etablerade exempel på jämförbara utformningar, i vissa fall med koder för att köra analysen med hjälp av olika programvarupaket.

Box, G.E.P, Hunter, W.G. och 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. och 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⁾ Statistiker som använder modelleringsmetoder som allmänna linjära modeller (GLM) kan använda analysen på ett annorlunda men jämförbart sätt. Det är inte nödvändigt att härleda den traditionella ANOVA-modellen, som bygger på algoritmiska metoder för statistisk beräkning som utvecklades före dataåldern..

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

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

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

(5) I del B ska kapitel B.12 ersättas med följande:

”B.12 Mikrokärntest av erythrocyter hos däggdjur

INLEDNING

Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje 474 (2016). Det är en del av en serie av testmetoder för genetisk toxikologi. Ett OECD-dokument som ger kortfattad information om tester inom genetisk toxikologi och en översikt över de senaste ändringarna av dessa testriktlinjer har utarbetats (1).

Mikrokärntest in vivo hos däggdjur är särskilt relevanta för att bedöma gentoxicitet, eftersom faktorer rörande in vivo-metabolism, farmakokinetik och DNA-reparationsprocesser är aktiva och bidrar till responsen, även om de varierar mellan arterna. Ett test in vivo är även användbart för fortsatta undersökningar av gentoxicitet, med detektion i ett in vitro-system.

Mikrokärntest in vivo hos däggdjur används för att detektera skador som testkemikalien inducerar på kromosomerna i den mitotiska funktionen hos erytroblaster. Testet utvärderar bildning av mikrokärnor i erythrocyter som antingen tas från benmärgen eller perifera blodceller hos djur, vanligen gnagare.

Avsikten med testet av mikrokärnor är att identifiera kemikalier som orsakar cytogen skada, vilket resulterar i bildning av mikrokärnor som antingen innehåller isolerade kromosomfragment eller hela kromosomer.

När en erytroblast från benmärg utvecklas till en omogen erythrocyt (ibland även kallad polykromatisk erythrocyt eller retikulocyt) stöts huvudkärnan ut. Eventuella mikrokärnor som har bildats kan stanna kvar i cytoplasman. Visualisering eller detektering av mikrokärnor underlättas i dessa celler eftersom de saknar en huvudkärna. En ökning av frekvensen av omogna erythrocyter med mikrokärnor hos behandlade försöksdjur utgör en indikation på inducerade strukturella eller numeriska kromosomavvikelser.

Nybildade erythrocyter med mikrokärnor identifieras och kvantifieras genom färgning, följt av antingen visuell klassificering med mikroskop eller genom automatisk analys. Ett tillräckligt stort antal erythrocyter måste räknas i perifert blod eller benmärgen hos vuxna djur. Räkningen underlättas avsevärt om man använder en automatisk klassificeringsplattform. Användningen av sådana plattformar är godtagbara alternativ till manuell utvärdering (2). Jämförande studier har visat att sådana metoder, med användning av lämpliga kalibreringsstandarder, kan ge bättre reproducerbarhet och sensitivitet inom laboratoriet än manuell klassificering med mikroskop (3) (4). Automatiska system som kan mäta frekvenser för erythrocyter med mikrokärnor är bland annat flödescytometrar (5), bildanalysplattformar (6) (7) och laserskanningcytometrar, även om det finns andra alternativ (8).

Även om det normalt inte görs under testet kan kromosomfragment särskiljas från hela kromosomer med hjälp av ett antal kriterier. Dessa innefattar identifiering av närvaron eller frånvaron av en kinetokor eller av centromer-DNA, som båda är karakteristiska för intakta kromosomer. Frånvaro av kinetokor eller av centromer-DNA tyder på att mikrokärnorna endast innehåller kromosomfragment, medan närvaro är ett tecken på kromosomförlust.

Definitioner av använd terminologi anges i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

Målvävnaden för genetisk skada i detta test är benmärg hos unga vuxna gnagare, eftersom erythrocyter bildas i denna vävnad. Mätning av mikrokärnor i omogna erythrocyter i perifert blod hos andra däggdjursarter är godtagbart om det har visats att arten är tillräckligt känslig för att detektera kemikalier som orsakar strukturella eller numeriska kromosomavvikelser hos dessa celler (genom induktion av mikrokärnor i omogna erythrocyter) och en vetenskaplig motivering ges. Frekvensen av omogna erythrocyter med mikrokärnor utgör den huvudsakliga slutpunkten. Frekvensen av mogna erythrocyter som innehåller mikrokärnor i perifert blod kan också användas som endpoint hos arter utan stark selektion i mjälten mot celler med mikrokärnor och när djuren behandlas kontinuerligt under en period som är längre än livslängden för erythrocyter hos den använda arten (t.ex. fyra veckor eller mer hos möss).

Om det finns bevis för att testkemikalien eller dessa metaboliter inte kommer att nå målvävnaden kan detta test vara olämpligt att använda.

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

TESTMETODENS PRINCIP

Försöksdjuren exponeras för testkemikalien på ett lämpligt sätt. Om benmärg används bör försöksdjuren avlivas humannt vid en lämplig tidpunkt efter behandling, varvid benmärgen extraheras och beredningar görs och färgas (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Om perifert blod används samlas blodet upp vid lämpliga tidpunkter efter behandling och beredningar görs, vilka sedan färgas in (12) (16) (17) (18). När behandlingen ges akut är det viktigt att välja lämpliga tidpunkter för skörd av benmärg eller blod så att behandlingsrelaterad induktion av omogna erythrocyter kan detekteras. Vid provtagning av perifert blod måste tillräckligt lång tid ha gått för att dessa händelser ska vara synliga i det cirkulerande blodet. Beredningarna analyseras med avseende på närvaro av mikrokärnor, antingen genom visualisering med användning av mikroskop, bildanalys, flödescytometri eller laserskanningcytometri.

KVALIFIKATIONSPRÖVNING AV LABORATORIET

Kvalifikationsprövning

För att fastställa att det finns tillräcklig erfarenhet av testet innan det används för rutintestning bör laboratoriet visa sin förmåga att reproducera förväntade resultat från publicerade data (17) (19) (20) (21) (22) för frekvenser av mikrokärnor med minst två positiva kontrollkemikalier (inklusive svag respons som induceras av låga doser av positiva kontroller) enligt tabell 1 och med förenliga vehikel-/lösningsmedelskontroller (se punkt 26). I försöken bör man använda doser som ger reproducerbara och dosrelaterade ökningar och visar testsystemets sensitivitet och dynamiska omfång när det gäller den berörda vävnaden (benmärg eller perifert blod), med användning av den klassificeringsmetod som laboratoriet tillämpar. Detta gäller inte laboratorier som redan har erfarenhet, dvs. har en historisk databas enligt punkterna 14–18.

Historiska kontrolldata

Laboratoriet bör fastställa följande i kvalifikationsprövningen:

- Ett historiskt positivt kontrollintervall och fördelning.
- Ett historiskt negativt kontrollintervall och fördelning.

Om data för en historisk negativ kontrollfördelning samlas in först bör de parallella negativa kontrollerna överensstämma med publicerade kontrolldata om sådana finns. Allteftersom den historiska kontrollfördelningen kompletteras med fler försöksdata bör de parallella negativa kontrollerna i idealfallet ligga inom fördelningens kontrollgräns på 95 %. Laboratoriets historiska negativa kontrolldatabas bör vara statistiskt robust för att säkerställa laboratoriets förmåga att bedöma fördelningen av negativa kontrolldata. Enligt litteraturen kan minst 10 försök behövas, men databasen bör helst bestå av minst 20 försök utförda under jämförbara försöksbetingelser. Laboratorierna bör använda kvalitetskontrollmetoder såsom kontrolldiagram (t.ex. C-diagram eller X-stapeldiagram (23)), för att fastställa hur variabla deras data är och för att visa att metoden är "under kontroll". Fler rekommendationer om hur man bygger upp och använder historiska kontrolldatabaser (t.ex. kriterier för att innefatta och utesluta data samt acceptanskriterier för ett givet försök) finns i litteraturen (24).

Om laboratoriet inte slutför ett tillräckligt antal försök för att fastställa en statistiskt robust negativ kontrollfördelning (se punkt 15) under kompetensundersökningarna (beskrivs i punkt 13) kan fördelningen byggas upp under de första rutintesterna. Denna strategi bör följa rekommendationerna i litteraturen (24) och de negativa kontrollresultat som erhållits i dessa experiment bör överensstämma med publicerade negativa kontrolldata.

Eventuella ändringar av försöksprotokollen bör övervägas för att se till att resulterande data fortfarande överensstämmer med laboratoriets befintliga historiska kontrolldatabas. Endast stora inkonsekvenser bör leda till upprättandet av en ny historisk kontrolldatabas om en fackgranskning fastslår att den skiljer sig från den föregående fördelningen (se punkt 15). Om en ny databas byggs upp kanske inte en fullständig negativ kontrolldatabas behövs för att utföra ett faktiskt test, under förutsättning att laboratoriet kan visa att dess parallella negativa kontrollvärden fortfarande överensstämmer med den tidigare databasen eller motsvarande publicerade data.

Negativa kontrolldata bör bestå av förekomsten av omogna erythrocyter med mikrokärnor hos varje djur. Parallella negativa kontroller bör helst ligga inom kontrollgränsen på 95 % för fördelningen av laboratoriets historiska negativa kontrolldatabas. Om parallella negativa kontrolldata faller utanför kontrollgränserna på 95 % kan de ändå ingå i den historiska kontrollfördelningen så länge de inte är extremt avvikande och det finns bevis för att testsystemet är under kontroll (se punkt 15) och att inga tekniska eller mänskliga fel begåtts.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Förberedelser

Val av djurart

Unga och friska vuxna exemplar som härrör från normala laboratoriestammar. Möss, råttor eller andra lämpliga däggdjursarter kan användas. När perifert blod används måste det fastställas att avlägsnandet av celler med mikrokärnor i mjälten från cirkulationen inte gör det svårare att detektera inducerade mikrokärnor i de arter som valts ut. Detta har tydligt visats hos perifert blod från möss och råttor (2). Om andra arter än råttor och möss används bör en vetenskaplig motivering lämnas i rapporten. Om andra arter än gnagare används bör mätningen av inducerade mikrokärnor integreras i ett annat lämpligt toxicitetstest.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

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

Förberedelse av djuren

Normalt används friska unga vuxna djur (6–10 veckor gamla vid behandlingsstarten, även om något äldre djur också är godtagbara) som slumpvis väljs ut till kontroll- och behandlingsgrupperna. Djuren ska ha en unik identifiering som appliceras med en human och minimalt invasiv metod (t.ex. ringmärkning, taggar, mikrochip eller biometrisk identifiering, men inte öron- eller tassclips). De bör vänjas vid förhållandena i laboratoriet under minst fem dagar. Burarna bör placeras i sådan ordning att eventuella verkningar på grund av placeringen minimeras. Korskontaminering av den positiva kontrollen och testkemikalien bör undvikas. Vid undersökningens början bör viktskillnaderna mellan försöksdjuren vara minimal och inte överstiga $\pm$ 20 % av medelvikten för varje kön.

Beredning av doser

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

Testbetingelser

Lösningsmedel/vehikel

Lösningsmedlet/vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna reagera kemiskt med testsubstanten. Om andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga används bör det finnas referensdata som visar att de är kompatibla. När det är möjligt, rekommenderas att man i första hand överväger vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar. Exempel på vanliga kompatibla lösningsmedel/vehiklar är vatten, fysiologisk saltlösning, metylcellulosalösning, karboximetylcellulosa natriumsaltlösning, olivolja och majsolja. I avsaknad av historiska eller publicerade kontrolldata som visar att inga effekter på mikrokärnor eller andra skadliga effekter induceras av det valda lösningsmedlet/vehikeln bör en preliminär undersökning utföras för att fastställa acceptansen för vehikelkontrollen.

Kontroller

Positiva kontroller

En grupp djur som behandlas med en positiv kontrollkemikalie bör normalt ingå i varje test. Denna regel kan frångås om testlaboratoriet har visat att det är kvalificerat att utföra testet och har fastställt ett historiskt positivt kontrollintervall. Om en parallell positiv kontrollgrupp inte ingår bör klassificeringskontroller (fixerade och ofläckade utstryksglas eller prover med cellsuspensioner, beroende på vad som är lämpligt för klassificeringsmetoden) inkluderas i varje försök. Detta kan åstadkommas genom att inbegripa lämpliga referensprover i klassificeringen av undersökningen som har erhållits och lagrats från ett separat positivt kontrollförsök som utförs med jämna mellanrum (t.ex. var 6:e till 18 månad), t.ex. under kvalifikationsprövning och vid behov med jämna mellanrum därefter.

Positiva kontrollkemikalier bör på ett tillförlitligt sätt ge en detekterbar ökning i frekvensen av mikrokärnor över den spontana nivån. Om klassificeringen görs manuellt med mikroskop bör positiva kontrolldoser väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga men inte omedelbart avslöjar identiteten hos de kodade proverna för bedömaren. Det är acceptabelt att den positiva kontrollen administreras via en annan tillförselväg än testkemikalien och enligt ett annat behandlingsschema, och att provtagningen endast sker vid ett tillfälle. Dessutom kan användningen av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier övervägas i förekommande fall. Exempel på positiva kontrollkemikalier ges i tabell 1.

Tabell 1

Exempel på positiva kontrollkemikalier.

Kemikalier och CASRN
Etylmetansulfonat [CASRN 62-50-0]
Metylmetansulfonat [CASRN 66-27-3]
Etylnitrosoarea [CASRN 759-73-9]
Mitomycin C [CASRN 50-07-7]
Cyklofosamid (monohydrat) [CASRN 50-18-0 (CASRN 6055-19-2)]
Trietylenmelamin [CASRN 51-18-3]
Colchicin [CASRN 64-86-8] eller vinblastin [CASRN 865-21-4] – som aneugens

Negativa kontroller

Djur från den negativa kontrollgruppen bör inkluderas vid varje provtagningstillfälle och i övrigt hanteras på samma sätt som behandlingsgrupperna, med undantag för att de inte behandlas med testkemikalien. Om lösningsmedel/vehikel används för att tillföra testkemikalien bör kontrollgruppen tillföras lösningsmedlet/vehikeln. Om testlaboratoriet påvisar konsekventa variationer mellan djur och frekvenser av celler med mikrokärnor genom historiska negativa kontrolldata vid varje provtagningstillfälle kan det dock vara tillräckligt med en enda provtagning för den negativa kontrollen. Om en enda provtagning används för negativa kontroller bör den vara det första provtagningstillfället i undersökningen.

Om perifert blod används är ett förbehandlat prov godtagbart i stället för en parallell negativ kontroll för kortvariga undersökningar om de resulterande uppgifterna överensstämmer med testlaboratoriets historiska kontrolldatabas. Det har visats att förbehandling av prov med små volymer (t.ex. under 100 µl/dag) hos råttor har en minimal inverkan på bakgrundsfrekvensen av mikrokärnor (25).

FÖRFARANDE

Djurens antal och kön

I regel är mikrokärnornas respons liknande mellan han- och hondjur och de flesta undersökningar kan därför utföras på endera könet (26). Om det finns data som visar på relevanta skillnader mellan hanar och honor (t.ex. skillnader i systemisk toxicitet, metabolism, biotillgänglighet, benmärgstoxicitet osv., inklusive ett preliminärt test) bör båda könen användas. I detta fall kan det vara lämpligt att göra en undersökning av båda könen, t.ex. som en del av en upprepade dosotoxicitetsundersökning. Om båda könen används kan ett faktorförsök vara lämpligt. En närmare beskrivning av hur man analyserar data med användning av faktorförsök ges i tillägg 2.

Gruppernas storlek vid försöksstarten bör fastställas. Målet bör vara minst fem analyserbara djur av ett kön, eller av vardera könet om båda används, per grupp. I de fall där exponering av människor för kemikalier kan ge könsspecifika resultat, som t.ex. för vissa läkemedel, bör testet utföras med försöksdjur av lämpligt kön. Som en vägledning för ett vanligt krav på maximalt antal djur skulle det krävas 25–35 djur för en benmärgsundersökning som utförs enligt de parametrar som fastställs i punkt 37, med tre dosgrupper och parallella negativa och positiva kontrollgrupper (fem djur av ett kön i varje grupp)

Dosnivåer

Om det inte finns några lämpliga data tillgängliga och en undersökning därför utförs för att fastställa omfattningen, bör denna undersökning utföras i samma laboratorium, och med samma arter, stammar, kön och behandlingsschema som senare ska användas i huvudundersökningen (27). Syftet med undersökningen bör vara att identifiera högsta tolererbara dos (MTD), som definieras som den dos som tolereras utan bevis för toxicitet som begränsar undersökningen i förhållande till dess varaktighet (t.ex. genom att inducera minskad kroppsvikt eller hematopoietisk systemcytotoxicitet, men inte dödlighet eller tecken på smärta, lidande eller ångest som kräver human avlivning (28)).

Den högsta dosen kan även definieras som en dos vilken ger upphov till toxicitet i benmärgen (t.ex. en reduktion av andelen omogna erythrocyter jämfört med det totala antalet erythrocyter i benmärgen eller i perifert blod på mer än 50 % men inte mindre än 20 % av kontrollvärdet). Om man analyserar CD71-positiva celler i den perifera blodcirkulationen (dvs. genom flödescytometri) reagerar denna mycket unga fraktion av omogna erythrocyter dock mycket snabbare på toxiska utmaningar än större RNA-positiva kohorter av omogna erythrocyter. Därför kan en skenbart högre toxicitet framträda i utformningar med akut exponering som undersöker CD71-positiva fraktioner av omogna erythrocyter jämfört med undersökningar som identifierar omogna erythrocyter baserat på RNA-innehåll. Om försökens behandlingstider är fem dagar eller kortare kan därför den högsta dosnivån för testkemikalier som orsakar toxicitet definieras som den dos som ger en statistiskt signifikant minskning av andelen CD71-positiva omogna erythrocyter av det totala antalet erythrocyter, men inte mindre än 5 % av kontrollvärdet (29).

Kemikalier som uppvisar mättnad av toxikokinetiska egenskaper eller inducerar avgiftningsprocesser som kan leda till minskad exponering efter långtidstillförsel kan vara undantag från kriterierna för dosbestämning och bör utvärderas från fall till fall.

För att inhämta data om dosrespons bör en fullständig undersökning omfatta en negativ kontrollgrupp och minst tre dosnivåer som vanligen skiljer sig med en faktor 2, men inte högre än 4. Om testkemikalien inte orsakar toxicitet i en preliminär undersökning eller baserat på befintliga uppgifter är den högsta dosen 1 000 mg/kg/kroppsvikt/dag för administrationsperioder på 14 dagar eller 2 000 mg/kg/kroppsvikt/dag för administrationsperioder på mindre än 14 dagar. Om testkemikalien orsakar toxicitet bör MTD vara den högsta dosen och de dosnivåer som används bör helst omfatta ett intervall från maxdos till en dos som producerar liten eller ingen toxicitet. När toxicitet i målvävnaden (benmärg) observeras vid alla testade dosnivåer rekommenderas fortsatta undersökningar med icke-toxiska doser. Undersökningar som syftar till att mer grundligt karakterisera kvantitativ information om dosrespons kan kräva ytterligare dosgrupper. Dessa gränser kan variera för vissa typer av testkemikalier (t.ex. humanläkemedel) som omfattas av särskilda krav.

Toleranstest

Om försök för att fastställa dosering eller befintliga data från besläktade djurstammar tyder på att ett behandlingssystem med minst gränsdosen (beskrivs nedan) inte ger några observerbara toxiska effekter (ingen minskning av benmärgens proliferation eller andra bevis på cytotoxicitet i målvävnaden), och om ingen gentoxicitet förväntas baserat på in vitro-undersökningar av gentoxicitet eller data från strukturellt besläktade kemikalier, anses det kanske inte nödvändigt med ett fullständigt test med tre dosnivåer, under förutsättning att det har påvisats att testkemikalien når målvävnaden (benmärg). I sådana fall kan en enda dosnivå, vid gränsdosen, vara tillräcklig. För administrationsperioder på 14 dagar eller mer är gränsdosen 1 000 mg/kg/kroppsvikt/dag. För administrationsperioder på mindre än 14 dagar är gränsdosen 2 000 mg/kg/kroppsvikt/dag.

Tillförsel av doser

Den förväntade exponeringsvägen för människor bör beaktas vid utformningen av en analys. Därför kan exponeringsvägar (t.ex. föda, dricksvatten, lokalt subkutant, intravenöst, oralt (via sond), inhalation, intratrakealt eller implantation) väljas som motiverad exponering. Exponeringsvägen bör i alla händelser väljas för att säkerställa lämplig exponering av målvävnaden. Intraperitoneal injektion rekommenderas generellt inte eftersom den inte är en avsedd exponeringsväg för människor, och bör endast användas med specifik vetenskaplig motivering. Om testkemikalien blandas i födan eller dricksvattnet bör man, särskilt i fråga om engångsdosering, se till att fördrojningen mellan födo- och vattenintag och provtagning är tillräcklig för att upptäcka effekterna (se punkt 37). Den maximala vätskevolymen som kan administreras genom sondmatning eller injektion vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör normalt inte överstiga 1 ml per 100 g kroppsvikt, utom för vattenlösningar där högst 2 ml/100 g får användas. Användning av volymer som är större än den bör motiveras. Med undantag för irriterande eller frätande testkemikalier, som normalt kommer att ge stegrade verkningar vid högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom justering av koncentrationen för att säkerställa att en konstant volym ges i förhållande till kroppsvikten vid alla dosnivåer.

Behandlingsschema

Företrädesvis utförs två eller fler behandlingar som ges i 24-timmarsintervaller, särskilt om detta test integreras i andra toxicitetsundersökningar. Alternativt kan enstaka behandlingar ges om det är vetenskapligt motiverat (om det t.ex. är känt att testkemikalien blockerar cellcykeln). Testkemikalierna kan också ges som en enstaka behandling, men kan även ges som en delad dos (dvs två eller flera behandlingar samma dag med högst 2–3 timmars mellanrum) för att underlätta tillförsel av stora volymer. Under dessa omständigheter eller när tillförseln av testkemikalien sker via inhalation bör provtagningstiden planeras baserat på tidpunkten för den sista doseringen eller när exponeringen upphör.

Testet kan utföras på möss eller råttor på ett av följande tre sätt:

- a. Djuren behandlas med testkemikalien en gång. Prover på benmärg tas ut minst två gånger (från oberoende djurgrupper) med början tidigast 24 timmar men senast 48 timmar efter behandling och med passande intervall mellan proven, om inte testkemikalien är känd för att ha en exceptionellt lång halveringstid. Om prover tas tidigare än 24 timmar efter behandling bör detta motiveras. Prover på perifert blod tas ut minst två gånger (från samma grupp av djur), med början tidigast 36 timmar efter behandling, och med passande intervall efter det första provet, men inte senare än efter 72 timmar. Vid det första provtagningstillfället bör alla dosgrupper behandlas och prover samlas in för analys. Vid senare provtagningstillfälle(n) behöver endast den högsta dosen ges. När ett positivt svar identifieras vid ett provtagningstillfälle är ytterligare provtagning inte nödvändig om inte kvantitativ dos-responsinformation behövs. De beskrivna skördetidpunkterna är följden av kinetiken, dvs. hur mikrokärnorna framträder och försvinner i de två vävnadsdelarna.
- b. Om två dagliga behandlingar utförs (t.ex. två behandlingar med 24 timmars intervall), bör prover tas ut en gång mellan 18 och 24 timmar efter den slutliga behandlingen av benmärgen eller en gång mellan 36 och 48 timmar efter den slutliga behandlingen av det perifera blodet (30). De beskrivna skördetidpunkterna är följden av kinetiken, dvs. hur mikrokärnorna framträder och försvinner i de två vävnadsdelarna.
- c. Om tre eller fler dagliga behandlingar utförs (t.ex. tre eller flera behandlingar med cirka 24 timmars intervall) bör benmärgsprov samlas in senast 24 timmar efter den sista behandlingen och perifert blod samlas in senast 40 timmar efter den sista behandlingen (31). Detta behandlingsalternativ utgör en kombination av Comet Assay (t.ex. provtagning 2–6 timmar efter den sista behandlingen) och mikrokärntestet, vilket integreras i toxicitetsundersökningar med upprepade doser. Befintliga uppgifter tyder på att induktion av mikrokärnor kan observeras under dessa längre tidsramar när testkemikalien har tillförts tre eller fler gånger (15).

Andra doserings- eller provtagningssystem kan användas när det är relevant, vetenskapligt motiverat och underlättar integration med andra toxicitetstester.

Observationer

Allmänna kliniska observationer av testdjuren bör göras och kliniska tecken registreras minst en gång per dag, helst vid samma tidpunkt med hänsyn till maximalt förväntade effekter efter doseringen. Djuren bör observeras minst två gånger dagligen under doseringsperioden beträffande morbiditet och mortalitet. Alla djur bör vägas när undersökningen inleds, åtminstone en gång i veckan under undersökningar med upprepade dosering och vid avlivning. För undersökningar som varar minst en vecka bör mätning av foderkonsumtion göras minst en gång i veckan. Om testkemikalien tillförs via dricksvattnet bör även vattenkonsumtionen mätas vid varje byte av vatten och minst en gång i veckan. Djur som uppvisar icke-dödliga indikatorer på överskottstoxicitet bör avlivas på ett humant sätt innan testperiodens slut (28). Under vissa omständigheter kan djurens kroppstemperatur övervakas, eftersom det är känt att hyper- och hypotermi till följd av behandling ger felaktiga resultat (32) (33) (34).

Exponering av målvävnaden

Blodprov tas vid lämpliga tidpunkter för att möjliggöra undersökningar av testkemikaliens plasmanivåer. Syftet med detta är att visa att benmärgen har exponerats om så krävs och om det inte finns andra exponeringsdata (se punkt 48).

Preparation av benmärg/blod

Benmärgsceller erhålls vanligen från lårbenet eller skenbenet omedelbart efter det att djuret avlivats på ett humant sätt. Normalt avlägsnas cellerna, prepareras och färgas in med hjälp av etablerade metoder. Små volymer av perifert blod kan erhållas enligt lämpliga djurskyddsnormer, antingen med hjälp av en metod där testdjuret överlever, t.ex. blödning från svansådern eller något annat lämpligt blodkärl, eller genom hjärtpunktering eller provtagning från ett stort blodkärl vid avlivning. Både för erythrocyter från benmärg och perifert blod, beroende på analysmetod, kan cellerna färgas in omedelbart supravitalt (16) (17) (18). Utstrykspreparat görs och färgas sedan in för mikroskopundersökning eller fixeras och färgas på lämpligt sätt för analys med flödescytometri. Användningen av ett DNA-specifikt färgämne (t.ex. akridinorange (35) eller Hoechst 33258 plus pyronin-Y (36)) kan eliminera några av de artefakter som är associerade med användning av ett färgämne som inte är DNA-specifikt. Denna fördel utesluter inte användningen av konventionella färgämnen (t.ex. Giemsa för mikroskopanalys). Ytterligare system (t.ex. cellulosakolonner för att avlägsna celler med kärnor (37) (38)) kan även användas, förutsatt att dessa system har visat sig vara förenliga med beredningen av prov i laboratoriet.

Om sådana metoder är tillämpliga kan system med anti-kinetokor-antikroppar (39), FISH-teknik med pancentromera DNA-prober (40) eller primad in situ-märkning med pancentromerspecifik primer, tillsammans med lämplig DNA-motfärgning (41), användas för att identifiera mikrokärnans karaktär (kromosom/kromosomfragment) för att fastställa om induktionen av mikrokärnor beror på klastogen och/eller aneugen aktivitet. Andra metoder för differentiering mellan klastogener och aneugener kan användas om de har visat sig vara effektiva.

Analys (manuell och automatisk)

Alla utstryksglas eller analysprover, inklusive glasen från de positiva och negativa kontrollerna, bör ges en oberoende kodning före analysen och bör randomiseras så att den manuella bedömarens inte känner till behandlingsbetingelserna. Kodning är inte nödvändig vid användning av automatiska klassificeringssystem som inte bygger på visuell kontroll och inte kan påverkas av bedömarens förutfattade mening. Andelen omogna erythrocyter bland det totala antalet erythrocyter (omogna + mogna) bestäms för varje djur genom att totalt räkna minst 500 erythrocyter för benmärg och 2 000 erythrocyter för perifert blod (42). Minst 4 000 omogna erythrocyter per djur bör undersökas med avseende på förekomst av omogna erythrocyter med mikrokärnor (43). Om den historiska databasen över negativa kontroller visar att bakgrundsmedelvärdet för frekvensen för omogna erythrocyter i mikrokärnor är < 0,1 % på testlaboratoriet bör man överväga att klassificera ytterligare celler. När proverna analyseras bör andelen omogna erythrocyter jämföras med det totala antalet erythrocyter hos de behandlade djuren inte vara mindre än 20 % av andelen vehikel-/lösningsskontroll vid klassificering med mikroskop, och inte mindre än cirka 5 % av andelen vehikel-/lösningsskontroll när CD71 + omogna erythrocyter klassificeras med cytometriska metoder (se punkt 31) (29). Exempel: I ett försök med benmärg som klassificeras med mikroskop där kontrollandelen omogna erythrocyter i benmärgen uppgår till 50 % skulle den övre toxicitetsgränsen vara 10 % omogna erythrocyter.

Råttans mjälte isolerar och förstör erythrocyter med mikrokärnor. För att upprätthålla en hög sensitivitet vid analyser av perifert blod från råttor bör analysen av omogna erythrocyter med mikrokärnor därför begränsas till den yngsta fraktionen. Vid användning av automatiska analysmetoder kan de mest omogna erythrocyterna identifieras via deras höga RNA-halt eller den höga nivån av transferrinreceptorer (CD71+), uttryckt på deras yta (31). En direkt jämförelse av olika färgningsmetoder har dock visat att tillfredsställande resultat kan erhållas med olika metoder, inklusive konventionell färgning med akridinorange (3) (4).

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

Individuella djurdata bör presenteras i tabellform. Antalet omogna erythrocyter som påträffas, antalet omogna erythrocyter med mikrokärnor, och andelen omogna bland det totala antalet erythrocyter bör listas separat för varje djur som analyseras. Om möss behandlas kontinuerligt under fyra veckor eller mer bör även uppgifter om antal och andel mogna erythrocyter med mikrokärnor anges om sådana uppgifter samlas in. Uppgifter om toxicitet för djur och kliniska tecken bör också rapporteras.

Kriterier för godkännande

Följande kriterier avgör om testet är godtagbart:

- a. Parallella negativa kontrolldata anses godtagbara för registrering i laboratoriets historiska databas (se punkterna 15–18).
- b. Parallella positiva kontroller eller klassificeringskontroller bör framkalla reaktioner som överensstämmer med de kontroller som genereras i den historiska databasen över positiva kontroller och ge en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen (se punkterna 24–25).
- c. Ett lämpligt antal doser och celler har analyserats.
- d. Urvalskriterierna för högsta dos överensstämmer med de kriterier som beskrivs i punkterna 30–33.

Utvärdering och tolkning av resultaten

Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart positiv om följande gäller:

- a. Åtminstone en av behandlingsgrupperna uppvisar en statistiskt signifikant ökning av frekvensen av omogna erythrocyter med mikrokärnor jämfört med den parallella negativa kontrollen.
- b. Ökningen är dosrelaterad vid minst ett provtagningstillfälle när den utvärderas med ett lämpligt trendtest.
- c. Något av resultaten ligger utanför fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser).

Om endast den högsta dosen undersöks vid ett visst provtagningstillfälle anses en testkemikalie vara klart positiv om det finns en statistiskt säkerställd ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen och resultaten ligger utanför fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser). Rekommendationer om de lämpligaste statistiska metoderna finns i litteraturen (44) (45) (46) (47). Om en dos-responsanalys genomförs bör minst tre behandlade dosgrupper analyseras. Statistiska tester som används bör betrakta djuret som den experimentella enheten. Positiva resultat i testet av mikrokärnor tyder på att testkemikalien inducerar mikrokärnor som är ett resultat av en kromosomskada eller skada på den mitotiska apparaten i erytroblasterna hos den art som testas. Om ett test utfördes för att detektera centromerer i mikrokärnorna är en testkemikalie som producerar mikrokärnor med centromerer (centromerisk DNA eller kinetokor, som visar på fullständig kromosomförlust) bevis på att testkemikalien är en aneugen.

Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart negativ om följande gäller för samtliga undersökta försöksbetingelser:

- a. Ingen av behandlingsgrupperna uppvisar en statistiskt signifikant ökning av frekvensen av omogna erythrocyter med mikrokärnor jämfört med den parallella negativa kontrollen.

- b. Ingen dosrelaterad ökning förekommer vid något provtagningstillfälle vid utvärdering med ett lämpligt trendtest.
- c. Alla resultat ligger inom fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser.
- d. Benmärgen exponerades för testkemikalien.

Rekommendationer om de lämpligaste statistiska metoderna finns i litteraturen (44) (45) (46) (47). Bevis för att benmärgen exponerats för en testkemikalie kan vara en minskning av förhållandet mellan omogna och mogna erythrocyter eller mätningar av plasma- och blodnivåerna i förhållande till testkemikalien. Vid intravenös tillförsel behövs inga bevis på exponering. Alternativt kan ADME-data, som erhållits i en oberoende undersökning med samma exponeringsväg och samma arter, användas för att visa benmärgsexponering. Negativa resultat indikerar att testkemikalien, under dessa försöksbetingelser, inte ger upphov till mikrokärnor i de omogna erythrocyterna hos den art som testas.

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

Om responsen varken är klart negativ eller klart positiv och för att göra det lättare att fastställa resultatets biologiska relevans (t.ex. en svag ökning eller en ökning som ligger på gränsen) bör de försök som slutförts fackgranskas och/eller undersökas ytterligare. I vissa fall kan analys av fler celler eller ett upprepat försök med modifierade försöksbetingelser vara användbart.

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

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande information:

Sammanfattning

Testkemikalie:

- Källa, partinummer, sista förbrukningsdag om detta anges.
- Testkemikalien's stabilitet, om den är känd.

Monokomponentämne:

- Fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.
- Kemiska beteckningar, såsom IUPAC- eller CAS-beteckning, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturell formel, renhet, kemisk beteckning på föreningar i förekommande fall och om möjligt osv.

Multikomponentämne, UVCB och blandningar:

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

Beredning av testkemikalien:

- motivering för val av vehikel,
- löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt,

- beredning av foder-, dricksvatten- eller inandningsberedningar,
- analytiska bestämningar av beredningar (t.ex. stabilitet, homogenitet, nominella koncentrationer) om sådana görs,

Försöksdjur:

- Art/stam som används och motivering av valet.
- Djurens antal, ålder och kön.
- Ursprung, inhysning, foder osv.
- Metod för unik identifiering av djuren.
- För korttidsundersökningar: individuell vikt hos försöksdjuren vid testets början och slut, för undersökningar som pågår längre än en vecka: individuella kroppsvikter under undersökningen samt foderkonsumtion, kroppsviktsintervall samt medelvärde och standardavvikelse för varje grupp bör inkluderas.

Testbetingelser:

- Positiva och negativa kontrolldata (vehikel/lösningsmedel).
- Data från en preliminär undersökning, om en sådan har utförts.
- Grund för valet av dosnivå.
- Uppgifter om beredning av testkemikalien.
- Uppgifter om administreringen av testkemikalien.
- Grund för administreringsväg och varaktighet.
- Metoder för att verifiera att testkemikalien nådde det stora kretsloppet eller målvävnaden.
- Faktisk dos (mg/kg kroppsvikt/dag) som beräknats genom dietens/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (ppm) och konsumtion, i tillämpliga fall.
- Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.
- Metod för avlivning.
- Smärtlindringsmetod (i förekommande fall).
- Detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman samt motivering av valen.
- Metoder för preparation av utstryksglas.
- Förfaranden för att isolera och bevara prover.
- Metoder för mätningar av toxicitet.
- Kriterier för bestämning av omogna erythrocyter med mikrokärnor.
- Antal analyserade celler per djur för bestämning av frekvensen av omogna erythrocyter i mikrokärnor samt andelen omogna erythrocyter jämfört med andelen mogna erythrocyter.
- Acceptanskriterier för undersökningen.
- Metoder, såsom användning av anti-kinetokor-antikroppar eller centromerspecifika DNA-prober, för att fastställa om mikrokärnorna innehåller hela eller fragmenterade kromosomer, om tillämpligt.

Resultat:

- Djurens skick före och under hela testperioden, inklusive tecken på toxicitet.
- Andelen omogna erythrocyter av det totala antalet erythrocyter.
- Antalet omogna erythrocyter med mikrokärnor, angett separat för varje djur.
- Medelvärde $\pm$ standardavvikelse för omogna erythrocyter med mikrokärnor per grupp.
- Dos/respons-förhållandet, där detta är möjligt.
- De statistiska analyser och metoder som användes.
- Parallella negativa och positiva kontrolldata, med omfattning, medelvärden och standardavvikelser.
- Historiska negativa och positiva kontrolldata med intervall, medelvärden, standardavvikelser och 95 % kontrollgränser för distribution, den tidsperiod som omfattas och antalet datapunkter.
- Uppgifter som styrker att exponering av benmärgen inträffade.
- Karaktiseringsdata som visar om mikrokärnorna innehåller hela eller fragmenterade kromosomer, i förekommande fall.
- Kriterier som uppfyllts för positiv eller negativ respons.

*Diskussion av resultaten.**Slutsatser**Litteraturhänvisningar*

LITTERATURHÄNVISNINGAR

- (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. m.fl. (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, s. 10–30.
- (3) MacGregor, J.T. m.fl. (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, s. 92–107.
- (4) Dertinger, S.D. m.fl. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, Toxicological Sciences, vol. 94/1, s. 83–91.
- (5) Dertinger, S.D. m.fl. (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage, Mutagenesis, vol. 26/1, s. 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, s. 65–73.
- (7) Asano, N. m.fl. (1998), An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravivally stained peripheral blood cells, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, vol. 404/1-2, s. 149–154.

- (8) Styles, J.A. m.fl. (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, *Cytometry*, vol. 44/2, s. 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, s. 187–190.
- (10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, *Mutation Research*, vol. 31/1, s. 9–15.
- (11) Heddle, J.A. m.fl. (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, s. 61–118.
- (12) Mavournin, K.H. m.fl. (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, s. 29–80.
- (13) MacGregor, J.T. m.fl. (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, *Developments in Toxicology Environmental Science*, vol. 11, s. 555–558.
- (14) MacGregor, J.T. m.fl. (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, vol. 189/2, s. 103–112.
- (15) MacGregor, J.T. m.fl. (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, s. 513–522.
- (16) Hayashi, M. m.fl. (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, vol. 245/4, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 45–50.
- (21) Hayes, J. m.fl. (2009), The rat bone marrow micronucleus test—study design and statistical power, *Mutagenesis*, vol. 24/5, s. 419–424.
- (22) Wakata, A. m.fl. (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, s. 84–100.
- (23) Ryan, T.P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

- (24) Hayashi, M. m.fl. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, vol. 723/2, s. 87–90.
- (25) Rothfuss, A. m.fl. (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, s. 108–120.
- (26) Hayashi, M. m.fl. (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, vol. 312/3, s. 293–304.
- (27) Fielder, R.J. m.fl. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, vol. 7/5, s. 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. m.fl. (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, Environmental and Molecular Mutagenesis, vol. 54/3, s. 222–228.
- (30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 $\pm$ 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, vol. 10/4, s. 313–319.
- (31) Hayashi, M. m.fl. (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, s. 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, s. 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, s. 7–14.
- (34) Spencer, P.J. m.fl. (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, Toxicological Sciences, vol. 97/1, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 411–415.
- (40) Miller, B.M. m.fl. (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, s. 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, s. 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, s. 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. m.fl. (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. m.fl. (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. m.fl. (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, *Environmental Health Perspectives*, vol. 102/Suppl 1, s. 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, s. 233–241.
-

Tillägg 1

DEFINITIONER

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

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Erytroblast: ett tidigt stadium i erythrocytens utveckling, omedelbart före det att den omogna erythrocyten bildas, där cellen fortfarande har en kärna.

Kinetokor: en proteinstruktur som bildas vid centromeren hos eukaryota celler vilken binder kromosomen till kärnspolens mikrotubuli under mitos och meios och som drar isär systerkromatiderna under celldelningen.

Mikrokärnor: små extra kärnor som är separata från cellernas huvudkärna, och som produceras under mitosens telofas (meios) från isolerade kromosomfragment eller hela kromosomer.

Normokromatisk eller mogen erythrocyt: fullt mogna erythrocyter som har förlorat det rest-RNA som kvarstår efter kärnbildningen och/eller har förlorat andra kortlivade cellmarkörer som vanligen försvinner efter kärnbildningen efter den slutliga delningen av erytroblasterna.

Polykromatisk eller omogen erythrocyt: nybildad erythrocyt i ett mellansteg i utvecklingen, som färgas med både de blå och röda komponenterna i klassisk blodinfärgning såsom Wrights Giemsa på grund av förekomsten av rest-RNA i den nybildade cellen. Sådana nybildade celler motsvarar ungefär retikulocyter, vilka visualiseras med hjälp av vitalfärgning som får rest-RNA att klumpas ihop till ett retikel. Nu för tiden används ofta andra metoder, bland annat monokromatisk färgning av RNA med fluorescerande färger eller märkning av kortlivade ytmarkörer som CD71 med fluorescerande antikroppar, för att identifiera nybildade röda blodceller. Polykromatiska erythrocyter, retikulocyter och CD71-positiva erythrocyter är alla omogna erythrocyter, men har en något annorlunda åldersfördelning.

Retikulocyt: nybildad erythrocyt som färgats med vitalfärgning som får rest-RNA i cellen att klumpa ihop sig till ett karakteristiskt retikel. Retikulocyter och polykromatiska erythrocyter har en liknande cellulär åldersfördelning.

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

Tillägg 2

**UTFORMNING AV FAKTORFÖRSÖK FÖR IDENTIFIERING AV SKILLNADER MELLAN KÖNEN
I IN VIVO-TEST MED AVSEENDE PÅ MIKROKÄRNOR****Utformning och analys av faktorförsök**

I denna utformning testas minst fem hanar och fem honor vid varje koncentrationsnivå, vilket innebär att minst 40 djur måste användas (20 hanar och 20 honor plus relevanta positiva kontroller).

Detta är ett av de enklaste faktorförsöken och det motsvarar en tvåvägs-variansanalys med kön och koncentrationsnivå som huvudsakliga effekter. Data kan analyseras med hjälp av många vanliga statistiska programvarupaket såsom SPSS, SAS, STATA, Genstat samt med hjälp av R.

Analysen delar upp variationen i datauppsättningen mellan kön, koncentrationer och interaktionen mellan kön och koncentrationer. Var och en av termerna testas mot en uppskattning av variationerna mellan replikatdjuren inom djurgrupper av samma kön som ges samma koncentration. Fullständig information om den underliggande metoden finns i många statistiska läroböcker (se litteraturhänvisningar) och i hjälpavsnitt i statistiska paket.

Nästa steg i analysen är att kontrollera interaktionstermen "kön x koncentration" i ANOVA tabellen ⁽¹⁾. I avsaknad av en signifikant interaktionsterm ger de kombinerade värdena mellan könen eller koncentrationsnivåerna giltiga statistiska test mellan nivåerna, baserat på den sammanslagna inomgruppsvariationen enligt ANOVA.

Nästa steg i analysen är att dela upp uppskattningen av variationen mellan koncentrationerna i kontraster, som möjliggör ett test avseende linjära och kvadratiske kontraster i responsen mellan koncentrationsnivåerna. Om en signifikant variation i kön x koncentration förekommer kan även denna term delas upp i interaktionskontraster enligt följande: linjära kontraster x kön och kvadratiske kontraster x kön. Med hjälp av dessa termer kan man testa om koncentrationsresponsen är parallell för de två könen eller om den skiljer sig åt.

Uppskattningen av den sammanslagna inomgruppsvariationen kan användas för parvisa test av skillnaderna mellan medelvärdena. Dessa jämförelser kan göras mellan medelvärdena för könen och medelvärdena för de olika koncentrationsnivåerna, t.ex. för jämförelser med de negativa kontrollnivåerna. Om det finns en signifikant interaktion kan man jämföra medelvärden för olika koncentrationer för samma kön eller medelvärden för båda könen vid samma koncentration.

Litteraturhänvisningar

Teori, utformning, metod, analys och tolkning av faktorförsök diskuteras i många statistiska läroböcker, från den enklaste tvåfaktorsanalysen till mer komplexa former som används i försöksutformningsmetoder ("Design of Experiment"). Följande förteckning är icke-uttömmande: Vissa böcker innehåller etablerade exempel på jämförbara utformningar, i vissa fall med koder för att köra analysen med hjälp av olika programvarupaket.

Box, G.E.P, Hunter, W.G. och 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. och 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⁾ Statistiker som använder modelleringsmetoder som allmänna linjära modeller (GLM) kan använda analysen på ett annorlunda men jämförbart sätt. Det är inte nödvändigt att härleda den traditionella ANOVA-modellen, som bygger på algoritmiska metoder för statistisk beräkning som utvecklades före dataåldern.

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

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

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

- (6) I del B ska kapitel B.15 utgå.
- (7) I del B ska kapitel B.16 utgå.
- (8) I del B ska kapitel B.18 utgå.
- (9) I del B ska kapitel B.19 utgå.
- (10) I del B ska kapitel B.20 utgå.
- (11) I del B ska kapitel B.24 utgå.
- (12) I del B ska kapitel B.47 ersättas med följande:

"B.47 Testmetoden BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability) för identifiering av i) kemikalier som orsakar allvarlig ögonskada och ii) kemikalier för vilka det inte krävs klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada

INLEDNING

Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 437 (2013). BCOP-testmetoden utvärderades 2006 och 2010 (1)(2) av amerikanska ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*) tillsammans med Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (ECVAM) och det japanska centret för validering av alternativa metoder (JaCVAM). I den första utvärderingen undersökte man om BCOP-testmetoden var användbar för att identifiera kemikalier (ämnen och blandningar) som framkallar allvarliga ögonskador (1). I den andra utvärderingen undersökte man om BCOP-testmetoden var användbar för att identifiera kemikalier (ämnen och blandningar) som inte är klassificerade för ögonirritation eller allvarliga ögonskador (2). BCOP-valideringsdatabasen innehöll totalt 113 ämnen och 100 blandningar (2) (3). Av dessa utvärderingar och granskningarna av dessa drog man slutsatsen att testmetoden korrekt kan identifiera kemikalier (både ämnen och blandningar) som inducerar allvarlig ögonskada (kategori 1) samt kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada enligt FN:s globala harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (4) och förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP-förordningen) (¹). Metoden ansågs därför vara vetenskapligt giltig för båda ändamålen. Med allvarlig ögonskada avses vävnadsskada i ögat eller allvarlig synnedläggelse som uppstår efter applicering av ett en testkemikalie på ögats främre yta och som inte är fullt reversibel inom 21 dagar från appliceringen. Testkemikalier som inducerar allvarliga ögonskador klassificeras som GHS-kategori 1 enligt FN:s system. Kemikalier som inte klassificerats för ögonirritation eller allvarliga ögonskador definieras som kemikalier som inte uppfyller kraven för att klassificeras som GHS-kategori 1 eller 2 (2A eller 2B), dvs. klassificeringen GHS Ingen klassificering. Denna testmetod beskriver rekommenderad användning av och begränsningar hos BCOP-testmetoden baserat på utvärderingarna. De största skillnaderna mellan den ursprungliga versionen från 2009 och den uppdaterade versionen från 2013 av OECD-testriktlinje avser, men är inte begränsade till, användning av BCOP-testmetoden för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering enligt GHS (punkterna 2 och 7), förtydliganden av tillämpningen av BCOP-testmetoden för testning av alkoholer, ketoner och fasta ämnen (punkterna 6 och 7) och av ämnen och blandningar (punkt 8), förtydliganden av hur ytaktiva ämnen och blandningar som innehåller ytaktiva ämnen bör testas (punkt 28), uppdateringar och förtydliganden av positiva kontroller (punkterna 39 och 40), uppdatering av beslutskriterierna för BCOP-testmetoden (punkt 47), en uppdatering av acceptanskriterier för undersökningar (punkt 48), en uppdatering av de uppgifter som ska ingå i provningsrapporten (punkt 49), en uppdatering av definitionerna i bilaga 1, en ny bilaga 2 om BCOP-testmetodens prediktionsförmåga enligt olika klassificeringssystem, en uppdatering av förteckningen över kemikalier för kvalitetstest samt en uppdatering av tillägg 4 om BCOP-hornhinnehållaren (punkt 1) och opacitetsmätaren (punkterna 2 och 3).

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

Det är allmänt vedertaget att inget ögonirritationstest in vitro inom överskådlig framtid kommer att kunna ersätta Draizes ögontest in vivo för att förutsäga alla typer av ögonirritation för olika kemiska klasser. Strategiska kombinationer av flera alternativa testmetoder inom ramen för en (differentierad) teststrategi kan dock ersätta Draizes ögontest (5). Uppifrån och ned-strategin (5) är utformad för att användas när en kemikalie förväntas vara mycket irriterande baserat på befintlig information, medan botten-upp-strategin (5) å sin sida är utformad för att användas när en kemikalie inte förväntas orsaka tillräcklig ögonirritation för att kräva en klassificering baserat på befintlig information. BCOP-testmetoden är en testmetod in vitro som kan användas under vissa omständigheter och med särskilda begränsningar för klassificering och märkning av kemikalier som är farliga för ögonen. BCOP-testmetoden anses i sig inte vara en giltig ersättning för test på kaninögon in vivo, men rekommenderas som ett första steg i en teststrategi såsom den uppifrån och ned-strategi som föreslagits av Scott m.fl. (5) För att identifiera kemikalier som inducerar allvarlig ögonskada, dvs. kemikalier som klassificeras som GHS-kategori 1, utan ytterligare testning (4). BCOP-testmetoden rekommenderas också för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada enligt definitionen i GHS (GHS Ingen klassificering) (4) inom ramen för en teststrategi som botten-upp-strategin (5). Kemikalier som inte förutsägs orsaka allvarlig ögonskada eller inte klassificeras för ögonirritation/allvarlig ögonskada enligt BCOP-testmetoden kräver dock ytterligare testning (in vitro och/eller in vivo) för att fastställa en definitiv klassificering.

Syftet med denna testmetod är att beskriva de förfaranden som används för att utvärdera om kemikalien kan vara skadlig för ögonen, mätt som kemikaliens förmåga att framkalla opacitet och öka permeabiliteten i en isolerad hornhinna från nötkreatur. De toxiska effekterna på hornhinnan mäts med hjälp av i) minskad ljustransmission (opacitet) och ii) ökad passage av natriumfluorescein (permeabilitet). Bedömningen av hornhinnans opacitet och permeabilitet efter exponeringen för testkemikalien kombineras till ett IVIS-värde (In Vitro Irritancy Score), som används för att klassificera testkemikaliens förmåga att framkalla irritation.

Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

Testmetoden baserar sig på BCOP-testmetodsprotokollet från amerikanska ICCVAM (6) (7), som i sin tur ursprungligen utvecklades på grundval av information från IIVS:s protokoll (*Institute for In Vitro Sciences*) och INVITTOX-protokollet 124 (8), som representerar det protokoll som användes för den förvalideringsstudie av BCOP-test som genomfördes 1997–1998 och sponsrades av Europeiska gemenskapen. Båda dessa protokoll baserades på den BCOP-testmetod som först rapporterades av Gautheron m.fl. (9).

BCOP-testmetoden kan användas för att identifiera kemikalier som inducerar allvarlig ögonskada enligt GHS, dvs. kemikalier som klassificeras som GHS-kategori 4 (4). När BCOP-testmetoden används för detta syfte har den en övergripande noggrannhet på 79 % (150/191), ett falskt positivt värde på 25 % (32/126) och ett falskt negativt värde på 14 % (9/65) jämfört med in vivo-testning på kaninögon enligt klassificeringssystemet GHS (3) (se

tillägg 2, tabell 1). När testkemikalier inom en viss kemikalie (dvs. alkoholer, ketoner) eller fysiska (dvs. fasta) klasser undantas från databasen har BCOP-testmetoden en övergripande noggrannhet på 85 % (111/131), ett falskt positivt värde på 20 % (16/81) och ett falskt negativt värde på 8 % (4/50) enligt klassificeringssystemet GHS (3). BCOP-testmetodens begränsningar när den används för att identifiera kemikalier som inducerar allvarlig ögonskada (GHS-kategori 1) baserar sig på höga falska positiva värden för alkoholer och ketoner och höga falska negativa värden för fasta ämnen som observerats i valideringsdatabasen (1)(2)(3). Alla alkoholer och ketoner överskattas dock inte av BCOP-testmetoden och vissa klassificeras korrekt som GHS-kategori 1, vilket innebär att dessa två organiska funktionella grupper inte anses gå utöver testmetodens tillämpningsområde. Det är upp till användaren av testmetoden att avgöra om en eventuell överprediktion av en alkohol eller en keton kan godtas eller om ytterligare testning krävs enligt en weight-of-the-evidence-metod. När det gäller falska negativa värden för fasta ämnen bör det noteras att fasta ämnen kan leda till varierande och extrema exponeringsförhållanden i Draizes ögonirritationstest in vivo, vilket i sin tur kan leda till irrelevanta förutsägelser om ämnets verkliga irritationspotential (10). När det gäller identifiering av kemikalier som inducerar allvarlig ögonskada (GHS-kategori 1) bör det också noteras att inget av de falska negativa värden som identifieras i ICCVAM-validationsdatabasen (2)(3) ledde till $IVIS \leq 3$, vilket är det kriterium som används för att identifiera en testkemikalie i GHS-kategorin Ingen klassificering. Falska negativa värden är inte kritiska i detta sammanhang, eftersom alla testkemikalier som ger ett värde på $3 < IVIS \leq 55$ därefter testas med andra lämpligt validerade in vitro-test och som ett sista alternativ på kaniner, beroende på kraven i tillämpliga bestämmelser, med tillämpning av en strategi med stegvis testning enligt principen om sammanvägd bedömning. Med tanke på att vissa fasta kemikalier korrekt klassificeras som GHS-kategori 1 enligt BCOP-testmetoden anses inte heller detta fysiska tillstånd gå utöver testmetodens tillämpningsområde. Forskare kan överväga att använda denna testmetod för alla kemikalier. I ett sådant fall bör $IVIS > 55$ godtas som en indikation på en respons som inducerar allvarlig ögonskada och kemikalien bör klassificeras som GHS-kategori 1 utan ytterligare testning. Som redan nämnts bör positiva resultat från test med alkoholer eller ketoner dock tolkas försiktigt på grund av risken för överprediktion.

BCOP-testmetoden kan också användas för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada enligt GHS-klassificeringssystemet (4). När BCOP-testmetoden används för detta syfte har den en övergripande noggrannhet på 69 % (135/196), ett falskt positivt värde på 69 % (61/89) och ett falskt negativt värde på 0 % (0/107) jämfört med in vivo-testning på kaninögon enligt klassificeringssystemet GHS (3) (se tillägg 2, tabell 2). Det falska positiva värde som erhålls (in vivo, kemikalier som klassificeras som GHS Ingen klassificering och som ger värdet $IVIS > 3$, se punkt 47) är högt, men inte kritiskt i detta sammanhang, eftersom alla testkemikalier som ger ett värde på $3 < IVIS \leq 55$ testas vidare med andra lämpligt validerade in vitro-test, eller som ett sista alternativ på kaniner beroende på lagstadgade krav, med användning av en stegvis teststrategi enligt en weight-of-evidence-metod. BCOP-testmetoden visar inga specifika brister när det gäller testning av alkoholer, ketoner och fasta ämnen när syftet är att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada (GHS Ingen klassificering) (3). Forskarna bör överväga att använda denna testmetod för alla typer av kemikalier. Ett negativt resultat ($IVIS \leq 3$) bör godtas som en indikation på att ingen klassificering krävs (GHS Ingen klassificering). Eftersom endast 31 % av de kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada kan identifieras med hjälp av BCOP-testmetoden, bör denna testmetod inte vara förstahandsvalet för en botten-upp-strategi (5), om andra validerade och godkända in vitro-metoder med liknande hög sensitivitet men högre specificitet finns tillgängliga.

BCOP-valideringsdatabasen innehöll totalt 113 ämnen och 100 blandningar (2) (3). BCOP-testmetoden anses därför vara tillämplig på testning av både ämnen och blandningar.

BCOP-testmetoden rekommenderas inte för identifiering av testkemikalier som bör klassificeras som irriterande för ögonen (GHS-kategori 2 eller 2A) eller testkemikalier som bör klassificeras som måttligt irriterande för ögonen (GHS-kategori 2b), eftersom det finns ett stort antal kemikalier i GHS-kategori 1 som är underklassificerade som GHS-kategori 2, 2A eller 2B medan andra kemikalier i GHS-kategorin Ingen klassificering är överklassificerade som GHS-kategori 2, 2A eller 2B (2) (3). Därför kan det krävas ytterligare testning med en annan passande metod.

Alla förfaranden som omfattar ögon och hornhinnor från nötkreatur bör respektera testningslaboratoriets tillämpliga regler och förfaranden för hantering av material som kommer från djur, omfattande men inte begränsat till vävnader och vävnadsvätskor. Likaså rekommenderas allmänna försiktighetsåtgärder för laboratorier (11).

BCOP-testmetoden beaktar inte skador på ögats bindhinna (konjunktiva) eller iris, men däremot skador på hornhinnan, som är den viktigaste in vivo-klassificeringen med avseende på GHS-klassificeringen. Reversibiliteten hos hornhinneskador kan i sig inte utvärderas med BCOP-test. På grundval av studier av kaninögon har det föreslagits att en bedömning av det initiala djupet för hornhinneskada kan användas för att identifiera vissa typer av irreversibla effekter (12). Det krävs dock ytterligare vetenskaplig kunskap för att man ska kunna förstå hur irreversibla effekter som inte är kopplade till en initialt allvarlig skada kan uppstå. Slutligen gäller att BCOP inte ger möjlighet att bedöma potentialen för systemisk toxicitet associerad med okulär exponering.

Testmetoden kommer att uppdateras regelbundet allteftersom ny information och data övervägs. Histopatologi kan t.ex. eventuellt vara användbart om en mer fullständig karakterisering av skador på hornhinnan krävs. Såsom anges i OECD:s vägledningsdokument nr 160 (13) uppmuntras användarna att bevara hornhinnor och bereda histopatologiska prover som kan användas för att utveckla en databas och beslutskriterier för att ytterligare förbättra metodens noggrannhet.

Laboratorier som tar denna testmetod i bruk för första gången bör använda de kvalifikationskemikalier som förtecknas i bilaga 3. Ett laboratorium kan använda dessa kemikalier för att påvisa sin tekniska kompetens att genomföra BCOP-testmetoden innan det lämnar in BCOP-testdata avsedda för lagstadgad faroklassificering.

TESTMETODENS PRINCIP

BCOP-testmetoden är en organotypisk modell enligt vilken hornhinnan från nötkreatur under kort tid bibehåller normal fysiologisk och biokemisk funktion in vitro. Testmetoden innebär att skador framkallade av testkemikalien bedöms med kvantitativa mätningar av ändringar i korneal opacitet och permeabilitet med opacitetsmätare respektive spektrofotometer för synligt ljus. Med hjälp av resultaten från de två mätningarna beräknas ett IVIS-värde som används för att bestämma en in vitro-klassificering av farokategori för prognos av testkemikaliens potential att framkalla ögonirritation in vivo (se beslutskriterierna i punkt 48).

För BCOP-testmetoden används isolerade hornhinnor från ögon som tillvaratagits från nyligen slaktade nötkreatur. Den korneala opaciteten mäts kvantitativt som ljustransmissionen genom hornhinnan. Permeabiliteten mäts kvantitativt som mängden natriumfluorescein som passerar genom hornhinnans hela djup enligt mätning i mediet i hornhinnehållarens bakre kammare. Kemikalierna appliceras på hornhinnans epitelyta via den främre kammaren. I tillägg 4 finns en beskrivning och en schematisk bild av den hornhinnehållare som används vid BCOP-testmetoden. Hornhinnehållare finns att köpa på marknaden hos olika leverantörer eller kan konstrueras i laboratoriet.

Källa och ålder för ögon från nötkreatur, val av djurart

Nötkreatur som sänds till slakterier avlivas i regel för användning som livsmedel eller för andra kommersiella ändamål. Endast friska djur som anses vara lämpliga för användning i livsmedelskedjan får användas för tillvaratagande av hornhinnor som används vid BCOP-testmetoden. Eftersom nötkreaturens vikt kan variera stort beroende på ras, ålder och kön finns det ingen rekommenderad slaktvikt för de djur som används.

Hornhinnornas dimensioner kan variera beroende på djurens ålder. Hornhinnor med en horisontell diameter $> 30,5$ mm och en central hornhinnetjocklek (CCT) ≥ 1100 μm kommer i regel från nötkreatur som är äldre än åtta år, medan hornhinnor med en horisontell diameter $< 28,5$ mm och CCT < 900 μm i regel kommer från nötkreatur som är yngre än fem år (14). Därför används normalt inte ögon från nötkreatur som är äldre än 60 månader. Ögon från nötkreatur som är yngre än 12 månader används i regel inte eftersom ögonen fortfarande håller på att utvecklas och hornhinnans tjocklek och diameter är betydligt mindre än de värden som rapporteras för ögon från vuxna nötkreatur. Hornhinnor från unga djur (6–12 månader) får dock användas eftersom det medför vissa fördelar såsom bättre tillgänglighet, smalare åldersintervall och lägre risker för att de anställda exponeras för bovin spongiform encefalopati (15). Det vore värdefullt med ytterligare utvärdering av hur hornhinnans storlek eller tjocklek påverkar responsen från frätande och irriterande kemikalier, och därför uppmanas användarna att rapportera uppskattad ålder och/eller vikt för de djur vars hornhinna använts för undersökningen.

Tillvaratagande och transport av ögon till laboratoriet

Ögonen tas till vara av slakteriets personal. För att minimera mekaniska och andra typer av skador på ögonen bör dessa tas till vara så snart som möjligt efter slakten och kylas omedelbart efter tillvaratagande och under transport. För att hindra att ögonen exponeras för potentiellt irriterande kemikalier bör rengöringsmedel inte användas vid sköljning av djurets huvud vid slakteriet.

Ögonen bör hållas helt nedsänkta i kylda HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) i ett kärl av lämplig storlek, och transporteras till laboratoriet på sådant sätt att skador och/eller bakterieförening minimeras. Eftersom ögonen tas till vara under slaktningen utsätts de eventuellt för blod och andra biologiska material, inbegripet bakterier och andra mikroorganismer. Det är därför viktigt att minimera föroreningsrisken (t.ex. genom att hålla kärlet med ögonen på krossad is under insamling och transport samt lägga till antibiotika i HBSS-förvaringslösningen, t.ex. 100 IE/ml penicillin eller 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin).

Tiden mellan tillvaratagande av ögonen och användningen av hornhinnorna i BCOP-testmetoden bör minimeras (normalt bör tillvaratagande och användning ske samma dag) och det måste påvisas att väntetiden inte stör analysresultaten. Dessa baserar sig på urvalskriterierna för ögonen såväl som på positiv och negativ kontrollrespons. Alla ögon som används för testning bör komma från samma grupp av ögon som har tillvaratagits en viss dag.

Urvalskriterier för ögon som används för BCOP-testmetoden

När ögonen har tagits emot vid laboratoriet ska de undersökas omsorgsfullt för skador såsom ökad opacitet, repor och nykärnbildning. Endast hornhinnor från oskadade ögon får användas.

De individuella hornhinnornas kvalitet utvärderas också i senare steg i testningen. Hornhinnor vars opacitet efter en inledande jämviktsperiod på en timme är högre än sju opacitetsenheter eller motsvarande för opacitetsmätaren och använda hornhinnehållare ska förkastas (OBS: opacitetsmätaren ska kalibreras med opacitetsstandarder för opacitetsenheter, se tillägg 4).

Varje behandlingsgrupp (testkemikalie, parallella negativa och positiva kontroller) ska bestå av minst tre ögon. För den negativa kontrollen enligt BCOP-testmetoden ska tre hornhinnor användas. Eftersom hornhinnorna skärs ut från globen som helhet och därefter monteras i hornhinnekamrarna, finns det en risk för att de individuella värdena för korneal opacitet och permeabilitet (inbegripet negativ kontroll) påverkas av artefakter från hanteringen. Vidare används opacitets- och permeabilitetsvärden från de negativa kontrollernas hornhinnor för att korrigera de opacitets- och permeabilitetsvärden från testade kemiskt behandlade och positivkontrollerade hornhinnor som används för IVIS-beräkningarna.

FÖRFARANDE

Förberedelse av ögonen

Defektfria hornhinnor skärs ut med en 2–3 mm omgivande kant av senhinna som är avsedd att underlätta efterföljande hantering. Var noga med att undvika skador på hornhinnans epitel och endotel. Hornhinnorna monteras en och en i särskilt utformade hornhinnehållare som har en bakre och en främre kammare som angränsar mot hornhinnans epitelsida respektive endotelsida. Båda kamrarna fylls med förvämt EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) i överskott (bakre kammaren först). Se till så att det inte bildas bubblor. Därefter hålls utrustningen vid 32 ± 1 °C i minst en timme så att jämvikt nås mellan mediet och hornhinnorna och normal metabolisk aktivitet uppstår i den mån det är möjligt (en hornhinna in vivo har en ungefärlig temperatur på 32 °C).

Efter jämviktsperioden tillsätts färskt förvämt EMEM fritt från fenolrött till båda kamrarna och grundvärden för opacitet mäts på varje hornhinna. Efter jämviktsperioden tillsätts färskt förvämt EMEM fritt från fenolrött till båda kamrarna och grundvärden för opacitet mäts på varje hornhinna. Alla hornhinnor som uppvisar en makroskopisk vävnadsskada (t.ex. repor, pigmentering, kärlnybildning) eller opacitet över 7 opacitetsenheter eller motsvarande för opacitetsmätaren och hornhinnehållarna ska förkastas. Opacitetsmedelvärden beräknas för alla jämviktsbehandlade hornhinnor. Minst tre hornhinnor väljs ut som exemplar för negativa kontroller (eller lösningsmedelskontroller). Återstående hornhinnor delas upp i behandlingsgrupp och positiv kontrollgrupp.

Eftersom vatten har en högre värmekapacitet än luft, ger vatten stabilare temperaturförhållanden för inkubation. Därför rekommenderas vattenbad för att hålla hornhinnehållaren och dess innehåll vid 32 ± 1 °C. Luftinkubatorer kan dock också användas under förutsättning att temperaturen hålls stabil (t.ex. genom förvärmning av hållare och media).

Applicering av testkemikalien

Två olika behandlingsprotokoll används, ett för vätskor och ytaktiva ämnen (fasta eller flytande) och ett för fasta ämnen som inte är ytaktiva.

Vätskor testas i utspädd form. Halvfasta ämnen, krämer och vaxer testas normalt som vätskor. Rena ytaktiva ämnen testas vid en koncentration på 10 % vikt/volym i en 0,9 % natriumkloridlösning, destillerat vatten eller annat lösningsmedel som påvisbart inte har negativa effekter på testsystemet. Om andra utspädningskoncentrationer används bör detta motiveras. Blandningar som innehåller ytaktiva ämnen kan testas utspädda eller utspädda till en lämplig koncentration, beroende på det aktuella exponeringsscenariot in vivo. Lämplig motivering bör ges för den testade koncentrationen. Hornhinnorna exponeras för vätskor och ytaktiva ämnen under 10 minuter. Om avvikande exponeringstider används bör tillbörlig vetenskaplig motivering ges. Definitioner av ytaktiva ämnen och blandningar innehållande ytaktiva ämnen ges i tillägg 1.

Fasta ämnen som inte är ytaktiva testas normalt som lösningar eller suspensioner vid 20 % vikt/volym i en 0,9 % natriumkloridlösning, destillerat vatten eller annat lösningsmedel som påvisbart inte har negativa effekter på testsystemet. I vissa förhållanden och med angivande av tillbörlig vetenskaplig motivering kan fasta ämnen också testas i ren form med direkt applicering på hornhinnans yta med användning av metoden med öppen kammare (se punkt 32). Hornhinnorna exponeras för fasta ämnen under fyra timmar, och på samma sätt som med vätskor och ytaktiva ämnen måste avvikande exponeringstider motiveras med tillbörliga vetenskapliga grunder.

Olika behandlingsmetoder kan användas, beroende på testkemikalens fysikaliska natur och kemiska egenskaper (t. ex. fasta ämnen, vätskor och viskösa respektive icke-viskösa vätskor). Den kritiska faktorn är att se till att testkemikalien täcker epitelytan tillräckligt och att det avlägsnas effektivt under sköljningsstegen. Metoden med slutna kammare används normalt vid testning av icke-viskösa till lätt viskösa kemikalier, medan metoden med öppen kammare normalt används för semiviskösa och viskösa kemikalier och rena fasta ämnen.

När slutna kammare används tillförs testkemikalien i den främre kammaren genom doseringshålen på kammarens övre yta i tillräcklig mängd (750 µl) för att täcka hornhinnans epitelsida och därefter hålls hålen förslutna med pluggar under exponeringen. Det är viktigt att varje hornhinna exponeras för testkemikalien under avsedd tidslängd.

När öppen kammare används ska den främre kammarens fönsterlåsring och glasfönster avlägsnas före behandlingen. Kontroll- eller testkemikalien (750 µl eller tillräckligt för att täcka hornhinnan helt) tillförs direkt på hornhinnans epitelyta med hjälp av en mikropipett. Om testkemikalien är svår att pipettera kan den i stället appliceras med en s.k. positive displacement-pipett. Positive displacement-pipettens spets införs i sprutans doseringsspets så att ämnet kan tryckas in i positive displacement-spetsen. Samtidigt dras sprutkolven ut medan pipettens pistong dras uppåt. Om det uppstår bubblor i pipettspetsen ska testkemikalien avlägsnas (tryckas ut) och förfarandet upprepas till dess att spetsen fylls utan att det uppstår luftbubblor. Vid behov kan man använda en vanlig spruta (utan nål) eftersom den ger möjlighet att mäta en exakt volym av testkemikalien och underlättar appliceringen på hornhinnans epitelyta. Efter doseringen monteras glasfönstret tillbaka på den främre kammaren så att systemet återförsluts.

Inkubation efter exponering

Efter exponeringsperioden avlägsnas testkemikalien, eller den kemikalie som används för negativ eller positiv kontroll, från den främre kammaren och epitelytan tvättas minst tre gånger (eller till dess att ingen testkemikalie kan observeras visuellt på ytan) med EMEM (med fenolrött). Medium innehållande fenolrött används för sköljning eftersom färgändringen av fenolrött kan användas som indikator på effektiv sköljning av sura eller alkaliska testkemikalier. Hornhinnorna ska tvättas mer än tre gånger om färgförändringen av fenolrött kvarstår (gult eller purpurrött) eller om rester av testkemikalien kan observeras. När mediet är rent från testkemikalien görs en slutsköljning av hornhinnorna med EMEM (utan fenolrött). EMEM (utan fenolrött) används som slutsköljning för att säkerställa att allt fenolrött avlägsnas från den främre kammaren före opacitetsmätningen. Därefter fylls den främre kammaren på nytt med färskt EMEM utan fenolrött.

För vätskor och ytaktiva ämnen ska hornhinnorna efter sköljning inkuberas i ytterligare två timmar vid 32 ± 1 °C. Längre tider kan vara till fördel under vissa omständigheter och kan övervägas från fall till fall. Hornhinnor som exponerats för fasta ämnen sköljs grundligt efter den fyra timmar långa exponeringen och kräver ingen efterföljande inkubation.

Efter den inkubationsperiod som följer på exponeringen (vätskor och ytaktiva ämnen) eller efter slutet av den fyra timmar långa exponeringsperioden (icke-ytaktiva fasta ämnen) görs mätningar av opaciteten och permeabiliteten för varje hornhinna. Varje hornhinna granskas också visuellt och relevanta observationer noteras (t.ex. avflagning av vävnad, rester av testkemikalien, oenhetliga opacitetsmönster). Sådana observationer kan vara viktiga eftersom de också är kopplade till variationer av opacitetsmätarens avläsningar.

Kontrollkemikalier

Parallella negativa kontroller eller lösningsmedels-/vehikelkontroller och positiva kontroller ingår i varje försök.

Vid testning av ett vätskeformigt ämne vid 100 % ska BCOP-testmetoden inbegripa en parallell negativ kontroll (t. ex. 0,9 % natriumkloridlösning eller destillerat vatten) så att icke-specifika ändringar i testsystemet kan upptäckas och för att ge en bakgrundsnivå för testningens endpoint. På så sätt säkerställs också att testningsförhållandena inte i onödan framkallar irritation.

Vid testning av en utspädd vätska, ett ytaktivt ämne eller ett fast ämne ska BCOP-testmetoden omfatta en parallell kontrollgrupp med lösningsmedel/vehikel så att icke-specifika ändringar i testsystemet kan upptäckas och för att ge en bakgrundsnivå för testningens endpoint. Endast lösningsmedel/vehikel som påvisbart inte har negativa effekter på testsystemet får användas.

En kemikalie som är känd att inducera positiv respons inkluderas som en parallell positiv kontroll i varje försök för att kontrollera testsystemets integritet och se till att det tillämpas korrekt. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsen kan bedömas över tiden bör den irritation som framkallas inte vara för stark.

Exempel på en positiv kontrollkemikalie för testning av flytande testkemikalier är 100 % etanol eller 100 % dimetylformamid. Exempel på en positiv kontrollkemikalie för testning av fasta ämnen är 20 % (vikt/volym) imidazol i 0,9 % natriumkloridlösning.

Referenskemikalier kan användas för utvärdering av förmågan att framkalla ögonirritation hos okända kemikalier tillhörande en specifik kemisk klass eller produktklass, eller för utvärdering av den relativa irritationspotentialen hos ett ögonirriterande ämne inom ett specifikt responsområde.

Mätning av endpoints

Opaciteten bestäms enligt ljustransmissionen genom hornhinnan. Hornhinnans opacitet mäts kvantitativt med hjälp av en opacitetsmätare som mäter opacitetsvärden på en kontinuerlig skala.

Permeabiliteten bestäms med hjälp av mängden natriumfluorescein som passerar hela hornhinnan (dvs. epitelet på hornhinnans yttre yta och genom hornhinnan till endotelet på hornhinnans inre yta). 1 ml natriumfluoresceinlösning (4 eller 5 mg/ml vid testning av vätskor och ytaktiva ämnen respektive icke-ytaktiva fasta ämnen) tillförs hornhinnehållarens främre kammare (den som angränsar mot hornhinnans epitelsida) medan den bakre kammaren (den som angränsar mot hornhinnans endotelsida) fylls med färskt EMEM. Därefter inkuberas hållaren i horisontellt läge i 90 ± 5 minuter vid 32 ± 1 °C. Mängden natriumfluorescein som kommer in i den bakre kammaren mäts kvantitativt med hjälp av UV/VIS-spektrofotometri. De spektrofotometriska mätningarna vid 490 nm noteras som optisk densitet (OD490) eller absorbansvärden som mäts på en kontinuerlig skala. Permeabilitetsvärdena för fluorescein bestäms genom OD490-värden med en spektrofotometer för synligt ljus och en standardväglängd på 1 cm.

Alternativt kan man använda en 96-håls mikrotiterplatta förutsatt att i) det linjära området för avläsning av plattan när det gäller fluorescein OD490-värden kan fastställas och ii) korrekt volym fluoresceinprover används i mikrotiterplattan för att få OD490-värden som motsvarar standardväglängden 1 cm (för detta krävs eventuellt att brunnen är helt full, i regel 360 l).

DATA OCH RAPPORTERING

Utvärdering av data

När opacitetsvärdena och permeabilitetsmedelvärdena (OD490) har korrigerats för bakgrundsopacitet och den negativa kontrollens permeabilitetsvärden (OD490), ska varje behandlingsgrupps medelvärden för opacitet och permeabilitet (OD490) kombineras i en empiriskt härledd formel för beräkning av IVIS-värdet (In Vitro Irritancy Score) enligt följande:

IVIS = medelvärdet för opacitet + $(15 \times \text{medelvärdet för permeabilitet OD490})$

Sina m.fl. (16) har rapporterat att denna formel härleddes under försök som utfördes inom och mellan laboratorier. Data som genererades för en serie med 36 föreningar i en undersökning som omfattade flera laboratorier användes som indata i en multivariat analys för bestämning av vilken ekvation som ger den bästa anpassningen mellan in vivo- och in vitro-data. Analysen genomfördes av forskare på två separata företag och de resulterande ekvationerna var nästan identiska.

Opacitets- och permeabilitetsvärdena bör också utvärderas fristående för att fastställa huruvida en testkemikalie har en frätande eller kraftigt irriterande verkan endast genom en av de två endpoints (se beslutskriterierna).

Beslutskriterier

IVIS-brytpunktsvärden för att identifiera testkemikalier som framkallar allvarliga ögonskador (GHS-kategori 1) och testkemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarliga ögonskador (GHS Ingen klassificering) ges nedan:

IVIS	GHS
≤ 3	Ingen klassificering
$> 3, \leq 55$	Ingen förutsägelse kan göras
> 55	Kategori 1

Kriterier för godkännande av ett försök

Ett försök anses vara godkänt om den positiva kontrollen ger ett IVIS-värde som faller inom två standardavvikelser för det aktuella historiska medelvärdet, som måste uppdateras minst var tredje månad, eller varje gång ett godkänt test genomförs i laboratorier där försök genomförs oregelbundet (mindre än en gång per månad). Responsen från den negativa kontrollen eller lösningsmedels-/vehikelkontrollen bör ge opacitets- och permeabilitetsvärden som är lägre än de fastställda övre gränserna för bakgrundsvärden för opacitet och permeabilitet för nötkreaturshornhinnor behandlade med negativa kontrollämnen eller lösningsmedel/vehikler. En enda testomgång med minst tre hornhinnor bör vara tillräcklig för en testkemikalie förutsatt att den resulterande klassificeringen är otvetydig. Om den första testomgången ger resultat som ligger på gränsen bör en andra testomgång övervägas (men är inte alltid nödvändig). Om medelvärdet för IVIS-resultaten inte överensstämmer mellan de två första testomgångarna bör en tredje testomgång övervägas. I detta sammanhang anses resultat i den första testomgången vara gränsfall om förutsägelseerna för de tre hornhinnorna inte överensstämde, om

- två av tre hornhinnor gav förutsägelser som inte överensstämde med medelvärdet för samtliga tre hornhinnor, ELLER
- om en av de tre hornhinnorna gav en förutsägelse som inte överensstämde med medelvärdet för samtliga tre hornhinnor OCH det icke-överensstämmande resultatet var > 10 IVIS enheter från brytpunkten 55.
- Om en upprepad testomgång bekräftar förutsägelsen från den första testomgången (baserat på IVIS-medelvärdet) kan ett slutligt beslut fattas utan ytterligare testning. Om resultaten från den upprepade testomgången ger en förutsägelse som inte överensstämmer med den första testomgången (baserat på IVIS-medelvärdet) bör en tredje och slutlig testomgång utföras för att lösa tvetydiga förutsägelser och klassificera testkemikalien. Undantag från kravet på ytterligare testning för klassificering och märkning kan göras om en testomgång ger en förutsägelse som överensstämmer med GHS-kategori 1.

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande uppgifter i den mån de är relevanta:

Test- och kontrollkemikalier:

- Kemisk beteckning såsom den strukturella beteckning som används i Chemical Abstracts Service (CAS) och eventuella andra kända beteckningar samt CAS-registreringsnummer om det är känt.

- Test-/kontrollkemikaliens renhet och sammansättning (viktprocent) i den mån uppgifterna finns att tillgå.
- Fysikalisk-kemiska egenskaper, t.ex. fysikaliskt tillstånd, flyktighet, pH, stabilitet, kemisk klass och vattenlöslighet, i den mån de är relevanta.
- Behandling av test-/kontrollämnen före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).
- Stabilitet, om den är känd.

Uppgifter om sponsor och testanläggning

- Namn och adress för sponsor, testanläggning och försöksledare.

Testmetodens betingelser

- Opacitetsmätare (t.ex. modell och specifikationer) samt instrumentinställningar.
- Kalibreringsinformation för utrustning som använts för mätning av opacitet och permeabilitet (t.ex. opacitetsmätare och spektrofotometer) för att säkerställa att mätningarna är linjära.
- Typ av hornhinnehållare (t.ex. modell och specifikationer).
- Beskrivning av annan använd utrustning.
- Det förfarande som används för att säkerställa testmetodens integritet (dvs. noggrannhet och tillförlitlighet) över tiden (t.ex. periodisk testning med kvalifikationskemikalier).

Kriterier för godtagbart försök

- Godtagbara intervaller för parallella positiva och negativa kontroller på grundval av historiska data.
- Om tillämpligt, godtagbara intervaller för parallella referenskontroller på grundval av historiska data.

Insamling och förberedelse av ögon

- Angivelse av ögonkällan (den anläggning där ögonen togs till vara).
- Hornhinnans diameter som ett mått på djurets ålder och lämplighet för försöket.
- Förvarings- och transportförhållanden för ögonen (t.ex. datum och tidpunkt för tillvaratagande, tidsperiod före inledning av försöket, transportmedium och temperaturförhållanden, eventuella antibiotika som använts).
- Förberedelse och montering av de nötkreaturshornhinnor som använts, inbegripet utlåtanden om deras kvalitet, temperatur för hornhinnehållare samt urvalskriterier för de hornhinnor som valts ut för testning.

TESTFÖRFARANDE

- Antal använda replikat.
- Uppgift om använda negativa och positiva kontroller (i förekommande fall även lösningsmedel och referenskontroller).
- Testkemikaliens koncentration(er), applicering, exponeringstid samt inkubationstid efter exponering.
- Beskrivning av utvärderings- och beslutskriterierna.
- Beskrivning av acceptanskriterierna för undersökningen.
- Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet.
- Beskrivning av beslutskriterierna.

Resultat

- Data i tabellform för enskilda testprover (t.ex. opacitet och OD490-värden och beräknade IVIS-värden för testkemikalien och de positiva och negativa kontrollerna samt referenskontroller om sådana ingått, inbegripet data från replikat och upprepade försök, beroende på vad som är lämpligt, och medelvärden inklusive standardavvikelse för varje försök).
- Beskrivning av övriga observerade effekter.
- Härledd GHS-klassificering *in vitro*, i förekommande fall.

Diskussion av resultaten

Slutsats

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. Finns på http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.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. Finns 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) FN (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York och Genève: Förenta nationerna. Finns 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. och 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. Finns på http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm.
- (7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. I: ICCVAM testmetod utvärderingsrapport – Aktuellt Validering status *in vitro* Testmetoder som föreslås för identifiering ögonskada farlighet av kemikalier och produkter. 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: 99-4494. 10-7553A. Finns på <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>.
- (8) JAGNVJAGTTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italien: Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (ECVAM).
- (9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. och Sina, J.F. (1992). Bovjagne corneal OPACjagty och permeABjagI Dety test: enn jagn vjagtro essay av ocular jagrrDetenncy. *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. Available: [<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. Antagen 25 oktober 2011. Paris Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling.
- (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. och Bradley, R. (1997). BSE: A decade on – Part I. *The Lancet* 349: 636–641.
- (16) Sjagna, J.F., Genler, D.M., Sussmen, R.S., Genutheron, P.D., Senrgsvt, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., Och Mjagller, 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 denna bilaga, Akut ögonirritation/ögonkorrosion.
- (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. Finns på [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.html].
- (19) OECD (1998). Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. No. 1: OECD:s principer om god laboratoriesed (omarbetade 1997).

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

Tillägg 1

DEFINITIONER

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

Referenskemikalie: en kemikalie som används som standard för jämförelse med en testkemikalie. En referenskemikalie bör ha följande egenskaper: i) eller flera enhetliga och tillförlitliga källor, ii) strukturell och funktionell likhet med den kemikalieklass som testas, iii) kända fysikalisk-kemiska egenskaper, iv) stödjande data om kända effekter och v) känd styrka inom det önskade responsområdet.

Botten-upp-strategi: stegvis metod som tillämpas på kemikalier som inte tros kräva klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada. Det första steget är att skilja kemikalier som inte behöver klassificeras (negativt utfall) från andra kemikalier (positivt utfall).

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Hornhinna (kornea): den transparenta delen på ögonglobens framsida som täcker iris och pupillen och släpper igenom ljus in i ögat.

Korneal opacitet: mått för den grad av opacitet som hornhinnan har efter exponering för en testkemikalie. Ökad korneal opacitet tyder på skador på hornhinnan. Opaciteten kan utvärderas subjektivt (Draizes test på kaninögon) eller objektivt med ett instrument såsom en opacitetsmätare.

Korneal permeabilitet: kvantitativt mått på skada på hornhinnans epitel genom bestämning av den mängd natriumfluorescein som passerar genom hornhinnans alla cellager.

Ögonirritation: ändringar som uppstår i ögat efter applicering av en testkemikalie på ögats främre yta och som inte är fullt reversibla inom 21 dagar från appliceringen. Utbytbart mot "Reversibla effekter på ögat" och "GHS-kategori 2" (4).

Falskt negativt värde: den andel av alla positiva ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som negativ. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

Falskt positivt värde: den andel av alla negativa (icke-aktiva) ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som positiva. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

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

In Vitro Irritancy Score (IVIS): en empiriskt härledd formel som används vid BCOP-testmetoden och där medelvärdet för opacitet och medelvärdet för permeabilitet för varje behandlingsgrupp kombineras till ett enda in vitro-värde. $IVIS = \text{medelvärdet för opacitet} + (15 \times \text{medelvärdet för permeabilitet})$

Irreversibla effekter på ögat: Se "Allvarliga ögonskador".

Blandning: En blandning eller en lösning som består av två eller flera ämnen i vilka de inte reagerar (4)

Negativ kontroll: ett obehandlat replikat som innehåller alla komponenter i ett testsystem. Detta prov hanteras tillsammans med testkemikaliebehandlade prover och andra kontrollprover för att avgöra huruvida lösningsmedlet påverkar testsystemet.

Ej klassificerad: Kemikalier som inte är klassificerade som ögonirriterande (GHS-kategori 2, 2A eller 2B) eller för allvarlig ögonskada (GHS-kategori 1). Utbytbart mot "GHS Ingen klassificering".

Opacitetsmätare: ett instrument för mätning av korneal opacitet genom en kvantitativ utvärdering av ljustransmissionen genom hornhinnan. Det har i regel två kamrar med var sin ljuskälla och var sin fotocell. Ena kammaren används för den behandlade hornhinnan och den andra används för kalibrering och nollställning av instrumentet. Ljus från en halogenlampa sänds genom kontrollkammaren (en tom kammare utan fönster eller vätska) till en fotocell och jämförs med ljuset som sänds genom försökskammaren (i vilken hornhinnan finns) till en fotocell. Instrumentet mäter skillnaden mellan fotocellernas ljustransmission och visar ett numeriskt värde på en digital display.

Positiv kontroll: ett replikat som innehåller testsystemets alla komponenter och behandlas med ett ämne som veterligen inducerar positiv respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsens variationer kan bedömas över tiden, bör den kraftiga irritation som framkallas inte vara för stark.

Reversibla effekter på ögat: se "ögonirritation".

Tillförlitlighet: mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när den utförs med hjälp av samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier och repeterbarheten inom laboratorier.

Allvarliga ögonskador: vävnadsskada i ögat eller kraftig synnedsättning som uppstår efter applicering av en testkemikalie på ögats främre yta och som inte är fullt reversibel inom 21 dagar från appliceringen (2). Utbytbart mot "Irreversibla effekter på ögat" och "GHS kategori 1" (4).

Lösningsmedels-/vehikelkontroll: ett obehandlat prov som innehåller testsystemets alla komponenter, inbegripet lösningsmedlet eller vehikeln som behandlas tillsammans med testkemikaliebehandlade prover och andra kontrollprover i syfte att fastställa bakgrundsrespons för de prover som behandlas med testkemikalien upplöst i samma lösningsmedel eller vehikel. När detta prov testas med en parallell negativ kontroll visar provet också huruvida lösningsmedlet eller vehikeln påverkar testsystemet.

Ämne: kemiska grundämnen och deras föreningar i naturlig eller framställd form, inklusive eventuella tillsatser nödvändiga för att bevara produktens stabilitet och sådana föroreningar som härrör från framställningsprocessen, men exklusive eventuella lösningsmedel som kan avskiljas utan att det påverkar ämnets stabilitet eller ändrar dess sammansättning (4).

Ytaktivt ämne: Ett ämne, såsom ett rengöringsmedel, som kan minska en vätskas ytspänning så att lödder bildas eller fasta ämnen penetrerar. Även kallat tensid eller vätmedel.

Blandning innehållande ytaktiva ämnen: inom ramen för denna testmetod, en blandning som innehåller ett eller flera ytaktiva ämnen med en slutlig koncentration på > 5 %.

Uppifrån och ned-strategi: stegvis metod som tillämpas på kemikalier som misstänks orsaka allvarlig ögonskada. Det första steget är att skilja kemikalier som inducerar allvarlig ögonskada (positivt utfall) från andra kemikalier (negativt utfall).

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

Stegvis testningsstrategi: en strategi för stegvis testning där all befintlig information om en testkemikalie granskas i en angiven ordning, med användning av förfarandet med sammanvägd bedömning (weight of evidence) för att avgöra om det finns tillräckligt med information till hands för att besluta om faroklassificering innan man går vidare till nästa steg. Om testkemikalien förmåga att framkalla irritation kan fastställas på grundval av befintlig information behövs ingen ytterligare testning. Om testkemikalien förmåga att framkalla irritation inte kan fastställas på grundval av befintlig information genomförs ett stegvis sekventiellt djurförsöksförfarande tills att det går att fastställa en otvetydig klassificering.

GHS (globalt harmoniserat system för klassificering och märkning av kemikalier): ett system för att klassificera ämnen och blandningar enligt standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker och informera om resultaten genom t.ex. piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad i syfte att informera om ämnens skadliga effekter för att skydda personer (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) och miljön (4).

GHS-kategori 1: se "allvarliga ögonskador".

GHS-kategori 2: se "ögonirritation".

GHS Ingen klassificering: Kemikalier som inte uppfyller kraven för att klassificeras som GHS-kategori 1 eller 2 (2A eller 2B). Utbytbart mot "Ej klassificerad".

Validerad testmetod: en testmetod för vilken valideringsstudier har genomförts för att fastställa relevans (inbegripet noggrannhet) och tillförlitlighet för ett specifikt ändamål. Det är viktigt att notera att en validerad testmetod kanske inte är tillräckligt noggrann och tillförlitlig när det gäller ett visst föreslaget ändamål

Sammanvägd bedömning: (weight of evidence) ett förfarande där man bedömer styrkor och svagheter hos flera uppgifter för att nå fram till och motivera en slutsats rörande en testkemikalies faropotential.

Tillägg 2

BCOP-TESTMETODENS FÖRUTSÄGANDE KAPACITET

Tabell 1

BCOP-testmetodens prediktionsförmåga att identifiera kemikalier som inducerar allvarliga ögonskador [GHS/EU CLP kat. 1 jämfört med Ingen kat. 1 (kat. 2 + Ingen kat.), US EPA kat. I jämfört med Ingen kat. I (kat. II + kat. III + kat. IV)]

Klassifi- cerings system	Nr	Noggrannhet		Känslighet		Falskt negativ		Specificitet		Falskt positiv	
		%	Nr	%	Nr	%	Nr	%	Nr	%	Nr
GHS EU CLP	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
US EPA	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Tabell 2

BCOP-testmetodens prediktionsförmåga att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering som ögonirriterande eller för allvarlig ögonskada ("icke-irriterande ämnen") [GHS EU CLP Ingen kat. mot Ingen kat. (kat. 1 + kat. 2), US EPA kat. IV mot Ingen kat. IV (kat. I + kat. II + kat. III)]

Klassifi- cerings system	Nr	Noggrannhet		Känslighet		Falskt negativ		Specificitet		Falskt positiv	
		%	Nr	%	Nr	%	Nr	%	Nr	%	Nr
GHS EU CLP	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
US EPA	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

Tillägg 3

KVALIFIKATIONSÄMNER FÖR BCOP-TESTMETODEN

Före rutinanvändning av en testmetod bör laboratoriet påvisa den tekniska kvaliteten genom att korrekt identifiera klassificeringen av kemikalier som är farliga för ögonen för de 13 kemikalier som rekommenderas i tabell 1. Dessa ämnen har valts ut för att representera responsskalan för ämnen som är farliga för ögonen enligt resultaten från in vivo-test på kaninögon (TG 405) (17) och GHS-kategorierna 1, 2A, 2B eller ingen klassificering (4). Till övriga kriterier hör att ämnena ska vara kommersiellt tillgängliga, att det finns tillgång till in vivo-referensdata av hög kvalitet och att det finns data av hög kvalitet från BCOP-testmetoden. Referensdata finns i Streamlined Summary Document (SSD) (3) och i ICCVAM Background Review Document för BCOP-testmetoden (2)(18).

Tabell 1

Rekommenderade ämnen för att påvisa teknisk kvalitet med BCOP-testmetoden

Kemikalie	CASRN	Kemisk klass ⁽¹⁾	Fysikalisk form	In vivo-klassificering ⁽²⁾	BCOP-klassificering
Bensalkoniumklorid (5 %)	8001-54-5	Oniumförening	Vätskor	Kategori 1	Kategori 1
Klorhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Fast ämne	Kategori 1	Kategori 1
Dibensoyl-L-tartarsyra	2743-38-6	Karboxylsyra, ester	Fast ämne	Kategori 1	Kategori 1
Imidazol	288-32-4	Heterocyklisk förening	Fast ämne	Kategori 1	Kategori 1
Triklorättiksyra (30 %)	76-03-9	Karboxylsyra	Vätskor	Kategori 1	Kategori 1
2,6-dimetylbensoylklorid	4659-45-4	Acyllhalid	Vätskor	Kategori 2A	Ingen exakt/tillförlitlig förutsägelse kan göras
Etyl-2-metylacetoacetat	609-14-3	Keton, ester	Vätskor	Kategori 2B	Ingen exakt/tillförlitlig förutsägelse kan göras
Ammoniumnitrat	6484-52-2	Oorganiskt salt	Fast ämne	Kategori 2 ⁽³⁾	Ingen exakt/tillförlitlig förutsägelse kan göras
EDTA, di-kaliumsalt	25102-12-9	Amin, karboxylsyra (salt)	Fast ämne	Ej klassificerat	Ej klassificerat
Tween 20	9005-64-5	Ester, polyeter	Vätskor	Ej klassificerat	Ej klassificerat

Kemikalie	CASRN	Kemisk klass ⁽¹⁾	Fysikalisk form	In vivo-klassificering ⁽²⁾	BCOP-klassificering
2-merkaptopyrimidin	1450-85-7	Acylhalid	Fast ämne	Ej klassificerat	Ej klassificerat
Fenylbutazon	50-33-9	Heterocyklisk förening	Fast ämne	Ej klassificerat	Ej klassificerat
Polyoxieten-23-lauryleter (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Alkohol	Vätska	Ej klassificerat	Ej klassificerat

Förkortningar: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number

⁽¹⁾ Varje testkemikalie tilldelades en kemisk klass med användning av ett standardsystem baserat på klassificeringssystemet National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (finns på <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ På grundval av in vivo-test på kaninögon (OECD TG 405) och med användning av GHS (17) (4).

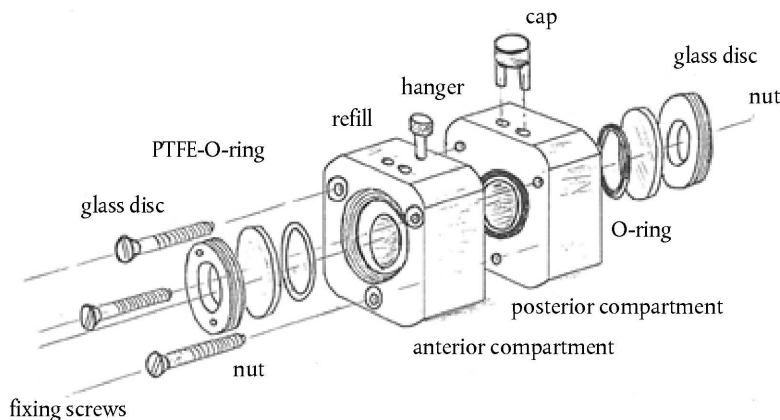
⁽³⁾ Klassificering i kategori 2A eller 2B beror på tolkningen av GHS-kriteriet för att skilja mellan dessa två kategorier, dvs. 1 av 3 jämfört med 2 av 3 djur med effekter på dag 7, vilket krävs för en klassificering i kategori 2A. In vivo-undersökningen omfattade tre djur. Alla resultatpunkter förutom rodnad konjunktiva hos ett djur återhämtades till noll dag 7 eller tidigare. Det djur som inte hade återhämtat sig fullständigt dag 7 hade en konjunktiv rodnad på 1 (dag 7) som var fullständigt återställd dag 10.

Tillägg 4

HORNHINNEHÅLLARE FÖR BCOP-TESTMETODEN

Hornhinnehållare för BCOP är gjorda av ett inert material (t.ex. polypropen). De består av två halvor (en främre och en bakre kammare) och har två likadana cylindriska inre kammare. Varje kammare rymmer 5 ml och har ett glasfönster genom vilket opacitetsmätningarna görs. De inre kamrarna mäter 1,7 cm i diameter och 2,2 cm i djup⁽¹⁾. Den bakre kammaren har en o-ring för att förhindra läckor. Hornhinnorna placeras med endotelsidan nedåt på den bakre kammarens o-ring och den främre kammaren placeras på hornhinnornas epitelsida. Kamrarna hålls på plats med hjälp av tre rostfria stålskruvar på kammarens ytterkanter. Varje kammare har ett glasfönster som kan tas bort för att enkelt nå hornhinnan. Det finns också en o-ring mellan glasfönstret och kammaren för att förhindra läckor. Upptill på varje kammare finns två hål för att tillsätta och ta bort medium och testkemikalier. Hålen försluts med gummiproppar under behandlings- och inkubationsperioderna. Ljustransmissionen genom hornhinnehållarna kan eventuellt ändras eftersom slitage eller ackumulering av specifika kemikaliska rester på den inre kammarens diameter eller på glasfönstren kan påverka ljusspridningen eller reflektansen. Följden kan bli ökning eller minskning i grundvärden för ljustransmission (och omvänt grundvärden för opacitet) genom hornhinnehållarna, och kan vara uppenbar som anmärkningsvärda förändringar i de förväntade grundvärdena vid initiala mätningar av hornhinneopacitet i individuella kammare (dvs, de initiala hornhinneopacitetsvärdena i särskilda individuella hornhinnehållare kan rutinmässigt skilja sig åt med mer än 2 eller 3 opacitetsenheter från de förväntade grundvärdena). Laborationerna bör införa program för att utvärdera ändringar i ljustransmissionen genom hornhinnehållarna, beroende på vilken typ av kemikalier som testas och hur ofta kamrarna används. För att fastställa jämförelsevärden kan man kontrollera hornhinnehållarna före rutinmässig användning genom att mäta grundvärden för opacitet (eller ljustransmission) i kamrarna, fyllda med komplett medium utan hornhinnor. Hornhinnehållarna kontrolleras därefter regelbundet för att upptäcka ändringar i ljustransmissionen under användningsperioderna. Laboratorierna kan fastställa kontrollintervaller för hornhinnehållarna baserat på testade kemikalier, användningsfrekvens och observationer av ändringar i grundvärdena för hornhinnornas opacitet. Om märkbara förändringar i ljustransmissionen genom hornhinnehållarna observeras måste laboratoriet överväga lämpliga rengörings- och/eller poleringsrutiner för hornhinnehållarnas yta eller byta ut hornhinnehållarna.

Hornhinnehållare: sprängskiss



⁽¹⁾ De här måtten utgår från hållare för hornhinnor från nötkreatur som är 12–60 månader gamla. För hornhinnor från djur som är 6–12 månader ska hållarna utformas så att varje kammare rymmer en volym på 4 ml och innerkamrarnas diameter är 1,5 cm och djup 2,2 cm. Vid utformningen av anpassade hornhinnehållare är det mycket viktigt att förhållandet mellan exponerad hornhinneyta och bakre kammarens volym är samma som motsvarande förhållande i en traditionell hornhinnehållare. Detta är nödvändigt för att säkerställa att permeabilitetsvärdena fastställs korrekt för beräkningen av IVIS med hjälp av den angivna formeln.

Tillägg 5

OPACITETSMÄTARE

Opacitetsmätaren används för mätning av ljustransmission. För OP-KIT-utrustningen från Electro Design (Riom, Frankrike) som användes för valideringen av BCOP-testmetoden, sänds t.ex. ljus från en halogenlampa sänds genom kontrollkammaren (en tom kammare utan fönster eller vätska) till en fotocell och jämförs med ljuset som sänds genom försökskammaren (i vilken hornhinnan finns) till en fotocell. Instrumentet mäter skillnaden mellan fotocellernas ljustransmission och visar ett numeriskt värde på en digital display. Opacitetsenheter fastställs. Andra typer av opacitetsmätare med andra inställningar (som t.ex. inte kräver parallella mätningar av kontroll- och försökskammarna) kan användas om de har visat sig ge samma resultat som den validerade utrustningen.

Opacitetsmätaren bör ge en linjär respons genom ett område av opacitetsmätningar som omfattar de brytpunkter som används för de olika klassificeringar som beskrivs i prognosmodellen (dvs. upp till brytpunkten för frätande verkan/kraftig irritation). För att säkerställa linjära och exakta avläsningar upp till 75–80 opacitetsenheter är det nödvändigt att kalibrera opacitetsmätaren med en serie kalibratorer. Kalibratorerna placeras i kalibreringskammaren (en hornhinnekammare utformad för kalibratorer) och avläsning görs på opacitetsmätaren. Kalibratorerna placeras i kalibreringskammaren med mer eller mindre det avstånd mellan ljus och fotocell som motsvarar hornhinnans placering vid opacitetsmätningarna. Referensvärden och initialt börvärde beror på vilken typ av utrustning som används. Opacitetsmätningars linjäritet bör säkerställas genom lämpliga (instrumentspecifika) förfaranden. För OP-KIT-utrustningen från Electro Design (Riom, Frankrike) kalibreras opacitetsmätaren först till 0 opacitetsenheter med hjälp av kalibreringskammaren utan en kalibrator. Därefter placeras tre olika kalibratorer en i sänder i kalibreringskammaren och avläsning görs av opacitetsvärdena. Kalibratorerna 1, 2 och 3 bör ge opacitetsavläsningar som motsvarar deras riktvärden på 75, 150 respektive 225 opacitetsenheter $\pm 5\%$.

(13) I del B ska kapitel B.48 ersättas med följande:

"B.48 Testmetoden ICE (Isolated Chicken Eye Test) för identifiering av i) kemikalier som orsakar allvarlig ögonskada och ii) kemikalier för vilka det inte krävs klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada

INLEDNING

Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 438 (2013). ICE-testmetoden (Isolated Chicken Eye) utvärderades 2006 and 2010 (1)(2) av amerikanska ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*) tillsammans med Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (ECVAM) och det japanska centret för validering av alternativa metoder (JaCVAM) 1) (2) (3). I den första utvärderingen godkändes ICE som en vetenskapligt giltig testmetod för användning som ett screeningtest för att identifiera kemikalier (ämnen och blandningar) som inducerar allvarlig ögonskada (kategori 1) enligt definitionen i FN:s globala harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (1) (2) (4) och förordning (EG) 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP-förordningen) ⁽¹⁾. I den andra utvärderingen undersökte man om ICE-testmetoden var användbar som ett screeningtest för att identifiera kemikalier som inte är klassificerade för ögonirritation eller allvarliga ögonskador enligt GHS (3) (4). Enligt resultaten från valideringsstudien och rekommendationerna från den expertpanel som granskat metoden behölls den ursprungliga rekommendationen om att använda ICE för klassificering av kemikalier som inducerar allvarlig ögonskada (GHS-kategori 1), eftersom den tillgängliga databasen inte ändrats sedan den ursprungliga ICCVAM-rekommendationen. I detta skede föreslås inga ytterligare rekommendationer om att utöka ICE-metodens

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

tillämpningsområde till att även omfatta andra kategorier. En förnyad utvärdering gjordes av de in vitro- och in vivo-datauppsättningar som använts för att bedöma om ICE-metoden är användbar för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada (5). Denna förnyade utvärdering visade att ICE-testmetoden även kan användas för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation och allvarlig ögonskada enligt definitionen i GHS (4) (5). Denna testmetod beskriver rekommenderad användning av och begränsningar hos ICE-testmetoden baserat på dessa utvärderingar. De största skillnaderna mellan den ursprungliga versionen från 2009 och den uppdaterade versionen från 2013 av OECD-testriktlinjen avser, men är inte begränsade till, användning av ICE-testmetoden för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering enligt GHS-klassificeringen, en uppdatering av de uppgifter som ska ingå i testrapporten, en uppdatering av tillägg 1 om definitioner och en uppdatering av tillägg 2 om kvalifikationskemikalier.

Det är allmänt vedertaget att inget ögonirritationstest in vitro inom överskådlig framtid kommer att kunna ersätta Draizes ögontext in vivo för att förutsäga alla typer av ögonirritation för olika kemiska klasser. Strategiska kombinationer av flera alternativa testmetoder inom ramen för en (differentierad) teststrategi kan dock ersätta Draizes ögontest (6). Uppifrån och ned-strategin (7) är utformad för att användas när en kemikalie förväntas vara mycket irriterande baserat på befintlig information, medan botten-upp-strategin (7) å sin sida är utformad för att användas när en kemikalie inte förväntas orsaka tillräcklig ögonirritation för att kräva en klassificering baserat på befintlig information. ICE-testmetoden är en testmetod in vitro som kan användas under vissa omständigheter och med särskilda begränsningar (som beskrivs i punkterna 8–10) för klassificering och märkning av kemikalier som är farliga för ögonen. ICE-testmetoden anses i sig inte vara en giltig ersättning för test på kaninögon in vivo, men rekommenderas som ett första steg i en teststrategi såsom den uppifrån och ned-strategi som föreslagits av Scott m. fl. (7) För att identifiera kemikalier som inducerar allvarlig ögonskada, dvs. kemikalier som klassificeras som GHS-kategori 1, utan ytterligare provning (4). ICE-testmetoden rekommenderas också för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada enligt definitionen i GHS (GHS ingen klassificering, NC) (4) och kan därför användas som ett första steg i en teststrategi som botten-upp-strategin (7). Kemikalier som inte förutsägs orsaka allvarlig ögonskada eller inte klassificeras för ögonirritation/allvarlig ögonskada enligt ICE-testmetoden kräver dock ytterligare testning (in vitro och/eller in vivo) för att fastställa en definitiv klassificering. Dessutom bör berörda tillsynsmyndigheter rådfrågas innan man använder ICE-metoden inom ramen för en botten-upp-strategi enligt andra klassificeringssystem än FN:s GHS.

Syftet med denna testmetod är att beskriva de förfaranden som används för att utvärdera om kemikalien kan vara skadlig för ögonen, mätt som kemikalins förmåga att inducera toxicitet eller ej i ett isolerat kycklingöga. De toxiska verkningarna på hornhinnan mäts genom i) kvalitativ bedömning av opacitet, ii) kvalitativ bedömning av skadan på epitel efter applicering av fluorescein på ögat (fluoresceinfärgning), iii) kvantitativ mätning av ökad tjocklek (svullnad) och iv) kvalitativ utvärdering av makroskopisk morfologisk skada på ytan. Korneal opacitet, svullnad och skadebedömning efter exponering för en testkemikalie utvärderas var för sig och kombineras till ett resultat som används för klassificering av ämnet med avseende på ögonirritation.

Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

Testmetoden baserar sig på det protokoll som föreslås i OECD:s vägledningsdokument 160 (8) som har tagits fram enligt ICCVAM:s internationella valideringsstudie (1) (3) (9), med bidrag från Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (ECVAM), det japanska centret för validering av alternativa metoder (JaCVAM) och TNO Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology (Nederländerna). Protokollet grundar sig på uppgifter från offentliggjorda protokoll och från det protokoll som för närvarande används av TNO (10) (11) (12) (13) (14).

En omfattande mängd olika kemikalier har testats vid den validering som ligger till grund för denna testmetod och valideringsstudiens empiriska databas uppgick till totalt 152 kemikalier, inklusive 72 ämnen och 80 blandningar (5). Testmetoden är tillämplig på fasta ämnen, vätskor, emulsioner och geler. Vätskorna kan vara vattenbaserade eller icke-vattenbaserade och de fasta ämnena kan vara vattenlösliga eller icke-vattenlösliga. Gaser och aerosoler har ännu inte bedömts genom valideringsstudier.

ICE-testmetoden kan användas för att identifiera kemikalier som inducerar allvarlig ögonskada, dvs. kemikalier som klassificeras som GHS-kategori 1 (4). När den används för detta syfte baserar de identifierade begränsningarna för ICE-testmetoden sig på höga falska positiva värden för alkoholer och höga falska negativa värden för fasta ämnen och ytaktiva ämnen (1) (3) (9). Falska negativa värden är dock inte kritiska i detta sammanhang (GHS-kategori 1, identifierade som inte tillhörande GHS-kategori 1), eftersom alla testkemikalier som ger ett negativt resultat därefter testas med andra lämpligt validerade in vitro-test och som ett sista alternativ på kaniner, beroende på kraven i tillämpliga bestämmelser, med tillämpning av en strategi med stegvis testning enligt principen om sammanvägd bedömning. Det bör noteras att fasta ämnen kan leda till varierande och extrema exponeringsförhållanden i Draizes ögonirritationstest in vivo, vilket i sin tur kan leda till irrelevanta förutsägelser om ämnets verkliga irritationspotential (15). Forskare kan överväga att använda denna testmetod för alla kemikalier. I ett sådant fall bör ett positivt resultat godtas som en indikation allvarlig ögonskada, dvs. klassificering i GHS-kategori 1 utan ytterligare testning. Positiva resultat från test med alkoholer bör dock tolkas försiktigt på grund av risken för överprediktion.

När ICE-testmetoden används för att identifiera kemikalier som ger upphov till allvarlig ögonskada (GHS-kategori 1) har den en övergripande noggrannhet på 86 % (120/140), ett falskt positivt värde på 6 % (7/113) och ett falskt negativt värde på 48 % (13/27) jämfört med in vivo-testning på kaninögon enligt klassificeringssystemet GHS (4) (5).

ICE-testmetoden kan också användas för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada enligt GHS-klassificeringssystemet (4). Berörda tillsynsmyndigheter bör rådfrågas innan man använder ICE-metoden inom ramen för en botten-upp-strategi enligt andra klassificeringssystem. Denna testmetod kan användas för alla typer av kemikalier, och ett negativt resultat kan godtas för att inte klassificera en kemikalie för ögonirritation och allvarlig ögonskada. På grundval av ett resultat från valideringsdatabasen kan organiska lösningsmedel med antifoulingeffekt som innehåller färg dock vara underskattade (5).

När ICE-testmetoden används för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation och allvarlig ögonskada har de en övergripande noggrannhet på 82 % (125/152), ett falskt positivt värde på 33 % (26/79) och ett falskt negativt värde på 1 % (1/73) jämfört med data från metoden för in vivo-testning på kaninögon enligt GHS (4) (5). När testkemikalier inom vissa klasser (t.ex. organiska lösningsämnen med antifoulingeffekt som innehåller färg) undantas från databasen har ICE-testmetoden en noggrannhet på 83 % (123/149), ett falskt positivt värde på 33 % (26/78) och ett falskt negativt värde på 0 % (0/71) enligt GHS (4) (5).

ICE-testmetoden rekommenderas inte för identifiering av testkemikalier som bör klassificeras som irriterande för ögonen (dvs. GHS-kategori 2 eller 2A) eller testkemikalier som bör klassificeras som måttligt irriterande för ögonen (GHS-kategori 2b), eftersom det finns ett stort antal kemikalier i GHS-kategori 1 som är underklassificerade som GHS-kategori 2, 2A eller 2B medan andra kemikalier i GHS-kategorin Ingen klassificering är överklassificerade som GHS-kategori 2, 2A eller 2B. Därför kan det krävas ytterligare testning med en annan passande metod.

Alla förfaranden som omfattar ögon från kycklingar bör respektera testningslaboratoriets tillämpliga regler och förfaranden för hantering av material som kommer från människor eller djur, omfattande men inte begränsat till vävnader och vävnadsvätskor. Likaså rekommenderas allmänna försiktighetsåtgärder för laboratorier (16).

ICE-testmetoden beaktar inte skador på ögats bindhinna (konjunktiva) eller iris, vilka utvärderas enligt testmetoden för öronirritation hos kaniner, men däremot skador på hornhinnan, som är den viktigaste in vivo-klassificeringen med avseende på FN:s GHS-klassificering. Dessutom gäller att även om reversibiliteten hos hornhinneskador i sig inte kan utvärderas vid ICE-test, har det på grundval av studier av kaninögon föreslagits att en bedömning av det initiala djupet för hornhinneskada kan användas för att identifiera vissa typer av irreversibla effekter (17). Det krävs i synnerhet ytterligare vetenskaplig kunskap för att man ska kunna förstå hur irreversibla effekter som inte är kopplade till en initialt allvarlig skada kan uppstå. Slutligen gäller att ICE inte ger möjlighet att bedöma potentialen för systemisk toxicitet associerad med okulär exponering.

Denna testmetod kommer att uppdateras regelbundet allteftersom ny information och data övervägs. Till exempel kan histopatologi vara potentiellt användbart när det behövs en mer fullständig karakterisering av skador på hornhinnan. För att utvärdera denna möjlighet uppmuntras användarna att bevara ögon och bereda histopatologiska prover som kan användas för att utveckla en databas och beslutskriterier för att ytterligare förbättra metodens noggrannhet. OECD har tagit fram ett vägledningsdokument om användning av okulära toxicitetsmetoder in vivo, som innehåller detaljerade förfaranden om insamling av histopatologiska prover och information om var prover och/eller histopatologiska data ska lämnas in (8).

Laboratorier som tar denna testmetod i bruk för första gången bör använda de kvalifikationskemikalier som förtecknas i tillägg 2. Ett laboratorium kan använda dessa kemikalier för att påvisa sin tekniska kompetens att genomföra ICE-testmetoden innan laboratoriet lämnar in ICE-testdata avsedda för lagstadgad faroklassificering.

TESTPRINCIP

ICE-testmetoden är en organotypisk modell enligt vilken kycklingögon under kort tid bibehåller normal fysiologisk och biokemisk funktion in vitro. Med denna testmetod utvärderas den skada som framkallats av testkemikalien genom bestämning av hornhinnans svullnad, opacitet och fluoresceinfärgning. De två senare parametrarna bedöms kvalitativt medan analysen av hornhinnans svullnad görs kvantitativt. Varje mätning konverteras till ett kvantitativt värde som används för att kalkylera ett övergripande irritationsindex eller för att tilldela en kvalitativ kategorisering som används för att fastställa en klassificering in vitro av kemikalier som är farliga för ögonen, antingen som GHS-kategori 1 eller GHS ingen klassificering. Dessa resultat kan sedan användas för att förutsäga risken för allvarlig ögonskada in vivo eller om testkemikalien inte behöver klassificeras som farlig för ögonen (se beslutskriterierna). Kemikalier som inte förutsägs orsaka allvarlig ögonskada eller inte klassificeras med ICE-testmetoden kan dock inte klassificeras (se punkt 11).

Källa och ålder för kycklingögon

I regel används ögon tillvaratagna från kycklingar som kommer från ett slakteri där de avlivats för användning som livsmedel, vilket eliminerar behovet av försöksdjur. Endast ögon från friska djur som anses lämpliga för livsmedelskedjan får användas.

Det har inte gjorts någon kontrollerad undersökning för att utvärdera optimal ålder för kycklingarna för testmetoden, men i regel används kycklingar som slaktats på vanligt sätt i ett fjäderfäslakteri (cirka 7 veckor gamla, 1,5–2,5 kg).

Tillvaratagande och transport av ögon till laboratoriet

Kycklingarnas huvuden ska avlägsnas omedelbart efter bedövning (i regel med elchock) med snitt i halsen för blödning. Kycklinghuvudena bör komma från en lokal källa nära laboratoriet så att de tillräckligt snabbt kan transporteras från slakteriet till laboratoriet för att minimera risken för skador och/eller bakterieförorening. Tidsintervallet mellan tillvaratagandet av kycklinghuvudena och placeringen av ögonen i superfusionsapparatens kammare efter isolering bör minimeras (i regel högst två timmar) för att säkerställa att försökskriterierna är uppfyllda. Alla ögon som används för testning bör komma från samma grupp av ögon som har tillvaratagits på en viss dag.

Ögonen avlägsnas i laboratoriet, och de orörda kycklinghuvudena ska därför transporteras från slakteriet vid rumstemperatur (normalt 18–25 °C) i plastlådor som fuktas med pappershanddukar indränkta i fysiologisk koksaltlösning.

Urvalskriterier och antal ögon som används för ICE-test

Ögon med högt grundvärde för fluoresceinfärgning ($> 0,5$) eller korneal opacitet ($> 0,5$) efter tillvaratagandet ska förkastas.

Varje behandlingsgrupp med parallell positiv kontroll består av minst tre ögon. Den negativa kontrollgruppen eller lösningsmedelskontrollen (om annat lösningsmedel än saltlösning används) ska bestå av minst ett öga.

När det gäller fasta material som leder till ett GHS NC-resultat rekommenderas en andra provomgång för att bekräfta eller avvisa det negativa resultatet.

FÖRFARANDE

Förberedelse av ögonen

Ögonlocken skärs bort försiktigt med undvikande av skador på hornhinnan. Hornhinnans intakta skick kan utvärderas snabbt med en droppe 2 % natriumfluorescein (vikt/volym) som appliceras på hornhinnans yta för några sekunder och därefter sköljs bort med fysiologisk koksaltlösning. De fluoresceinbehandlade ögonen undersöks därefter med spaltlampa för att kontrollera att hornhinnan är intakt (värdet för fluoresceinfärgning och korneal opacitet $\leq 0,5$).

Förutsatt att hornhinnan är intakt skärs ögat ut från skallen med varsamhet så att hornhinnan inte skadas. Ögongloben dras ut ur ögonhålan med ett stadigt grepp om blinkhinnan med hjälp av kirurgisk tång och ögonmusklerna klipps av med en böjd trubbig sax. Det är viktigt att greppet om hornhinnan inte är så starkt att det uppstår skador (t.ex. kompressionsartefakter).

När ögat har tagits ut ur hålan bör det finnas kvar en vidfäst synlig del av synnerven. Därefter placeras ögat på ett absorberande underlag och blinkhinnan och annan bindvävnad skärs bort.

Därefter monteras ögat i en klämma av rostfritt stål med hornhinnan i upprätt riktning. Klämman med ögat överförs till superfusionsapparaten (18). Klämmorna ska placeras i superfusionsapparaten så att droppet med fysiologisk koksaltlösning når hela hornhinnan (3–4 droppar per minut eller 0,1–0,15 ml/min.). Superfusionsapparatens kammare ska ha en kontrollerad temperatur på $32 \pm 1,5$ °C. I tillägg 3 finns en schematisk bild av en typisk superfusionsapparat med ögonklämmor. Utrustningen kan anskaffas kommersiellt eller konstrueras i laboratoriet. Apparaten kan också anpassas efter behoven vid ett enskilt laboratorium (t.ex. för att hålla ett avvikande antal ögon).

Efter att ögonen placerats i superfusionsapparaten granskas de på nytt med spaltlampa för att kontrollera att de inte har fått skador under dissektionen. Samtidigt ska även hornhinnans tjocklek mätas vid hornhinnans apex med hjälp av spaltlampans tillbehör för djupmätning. Ögon som har i) fluoresceinfärgningsvärde $> 0,5$, ii) värde för korneal opacitet $> 0,5$ eller iii) andra tecken på skada ska bytas ut. Ögon som inte har förkastats enligt något av dessa kriterier men där hornhinnans tjocklek avviker mer än 10 % från medelvärdet för alla ögon ska förkastas. Det är viktigt att vara medveten om att spaltlampan kan ge olika värden på hornhinnans tjocklek beroende på inställningen för spaltbredd. Spaltbredden ska ställas in på 0,095 mm.

Undersökta och godkända ögon inkuberas i cirka 45–60 minuter för att få dem i jämvikt med testsystemet före doseringen. Efter jämviktsperioden görs en referensmätning av hornhinnans tjocklek och opacitet för att få ett grundvärde (tid = 0). Fluoresceinvärdet som uppmättes vid dissektionen används som grundvärde för denna endpoint.

Applicering av testkemikalien

Omedelbart efter mätningarna av nollreferens tas ögonen (i sina hållare) bort ur superfusionsapparaten, placeras i liggande läge och testkemikalien appliceras på hornhinnan.

Vätskeformiga testkemikalier används i regel i outspädd form men kan spädas ut om det bedöms vara nödvändigt (t.ex. som en del av försöksutformningen). Eventuell utspädning ska helst göras med fysiologisk koksaltlösning. Andra lösningsmedel än fysiologisk koksaltlösning kan användas under kontrollerade förhållanden men då bör lämpligheten påvisas.

Vätskeformiga testkemikalier appliceras på hornhinnan så att hela ytan är jämnt täckt med testkemikalien (standardvolymen är 0.03 ml).

Fasta testkemikalier ska så långt det är möjligt finfördelas i mortel eller motsvarande redskap. Pulvret appliceras så att hornhinnan blir jämnt täckt med testkemikalien. Standardmängden är 0,03 g.

Testkemikalien (vätska eller fast ämne) får verka på hornhinnan i 10 sekunder och sköljs sedan bort från ögat med rumstempererad fysiologisk koksaltlösning (cirka 20 ml). Ögat (i sin hållare) återförs därefter till superfusionsapparaten i ursprunglig upprätt position. Vid behov kan en ytterligare sköljning göras efter 10 sekunders applicering och vid olika tidpunkter därefter (t.ex. om man upptäcker rester av testkemikalien på hornhinnan). I regel är den mängd saltlösning som används för sköljning inte en kritisk faktor, men det är viktigt att kontrollera att kemikalien fäster vid hornhinnan.

Kontrollkemikalier

Parallella negativa kontroller eller lösningsmedels-/vehikelkontroller och positiva kontroller ska ingå i varje försök.

Vid testning av outspädda vätskor eller fasta ämnen med ICE-testmetoden ska fysiologisk koksaltlösning användas som parallell negativ kontroll för att upptäcka icke-specifika ändringar i testsystemet och för att säkerställa att testningsförhållandena inte i onödan framkallar irritation.

Vid testning av utspädda vätskor ska en parallell negativ kontrollgrupp för lösningsmedel/vehikel inbegripas för att upptäcka icke-specifika ändringar i testsystemet och för att säkerställa att testningsförhållandena inte i onödan framkallar irritation. Som det konstateras i punkt 31 får endast lösningsmedel/vehikel som påvisbart inte har negativa effekter på testsystemet användas.

Ett känt ögonirriterande ämne ska ingå som parallell positiv kontroll i varje försök för att bekräfta att rätt slags respons framkallas. Eftersom ICE används i denna testmetod för att identifiera frätande eller kraftigt irriterande ämnen, ska den positiva kontrollen göras med en referenskemikalie som framkallar kraftig respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsens variationer över tiden kan bedömas, bör den kraftiga irritation som framkallas inte vara för stark. Tillräckliga in vitro-data bör genereras för den positiva kontrollen så att det går att beräkna ett godtagbart intervall för denna. Om det inte finns tillbörliga historiska ICE-testmetodsdata för en särskild positiv kontroll måste man eventuellt genomföra försök för att få fram denna information.

Exempel på positiva kontroller för vätskeformiga testkemikalier är 10 % ättiksyra eller 5 % bensalkoniumklorid, och exempel på positiva kontroller för fasta testkemikalier är natriumhydroxid eller imidazol.

Referenskemikalier kan användas för utvärdering av förmågan att framkalla ögonirritation hos okända kemikalier tillhörande en specifik kemisk klass eller produktklass, eller för utvärdering av den relativa irritationspotentialen hos ett ögonirriterande ämne inom ett specifikt responsområde.

Mätning av endpoints

Hornhinnorna utvärderas före behandlingen och vid 30, 75, 120, 180 och 240 minuter (± 5 minuter) efter den sköljning som görs efter behandlingen. Dessa tidpunkter ger ett tillbörligt antal mätningar under den fyra timmar långa behandlingsperioden och ger tillräckligt med tid mellan mätningarna för att genomföra observationerna av alla ögon.

De endpoints som ska bedömas är korneal opacitet, svullnad, fluoresceinfärgning och morfologiska effekter (t.ex. gropbildning eller avlossning av epitel). Alla endpoints, med undantag av fluoresceinfärgning (som endast bestäms före behandlingen och 30 minuter efter exponering av testkemikalien) bestäms vid alla de ovan nämnda tidpunkterna.

Fotografier rekommenderas för dokumentering av korneal opacitet, fluoresceinfärgning, morfologiska verkningar och, i förekommande fall, histopatologi.

Efter den sista granskningen vid tidpunkten fyra timmar är det rekommendabelt att hålla ögonen i lämpligt konserveringsmedel (t.ex. neutralt formalin med buffert) med tanke på eventuell histopatologisk undersökning (se punkt 14 och hänvisning 8 för närmare uppgifter).

Hornhinnans svullnad bestäms genom mätningar av hornhinnans tjocklek med en pachymeter eller spaltlampa. Svullnaden uttrycks som ett procenttal och beräknas på grundval av mätningarna enligt följande formel:

$$\left(\frac{\text{hornhinnans tjocklek vid tiden } t - \text{hornhinnans tjocklek vid tiden } = 0}{\text{hornhinnans tjocklek vid tiden } = 0} \right) \times 100$$

Medelvärdet för hornhinnans svullnad för alla testögon beräknas för alla observationstidpunkter. Det högsta medelvärdet för svullnad oavsett observationstidpunkt används som grund för en övergripande kategorisering av testkemikalien (se punkt 51).

Den korneala opaciteten utvärderas på grundval av mätningarna på det område av hornhinnan som har den tätaste opaciteten enligt tabell 1. Medelvärdet för den korneala opaciteten för alla testögon beräknas för alla observationstidpunkter. Det högsta medelvärdet för korneal opacitet oberoende av tidpunkt används som grund för en övergripande kategorisering av testkemikalien (se punkt 51).

Tabell 1

Värden för korneal opacitet.

Gradering	Observation
0	Ingen opacitet.
0,5	Mycket svag opacitet.
1	Spridda eller diffusa områden med opacitet, alla detaljer i iris är klart synliga.
2	Enkelt skönjbart translucent område, detaljerna i iris är lätt förmörkade.
3	Kraftig korneal opacitet, inga detaljer i iris är synliga, pupillens storlek kan knappat urskiljas.
4	Fullständig korneal opacitet, iris syns inte.

Fluoresceinfärgningen utvärderas efter 30 minuters observationstid enligt tabell 2. Medelvärde för fluoresceinfärgning för alla testögon beräknas därefter för observationstidpunkten 30 minuter och används för övergripande kategorivärde som ges för varje testkemikalie (se punkt 51).

Tabell 2

Värden för fluoresceinfärgning.

Gradering	Observation
0	Ingen fluoresceinfärgning.
0,5	Mycket svag färgning av enskilda celler.
1	Färgning av enskilda celler spridda över hornhinnans behandlade yta.
2	Fokal eller konfluent tät färgning av enskilda celler.
3	Konfluenta stora områden av hornhinnan har färgats av fluorescein

Till de morfologiska effekterna hör gropbildning i hornhinnans epitel, avlossning av epitel, uppruggning av hornhinnans yta och vidfästning av testkemikalien vid hornhinnan. Dessa observationer kan ha olika allvarlighetsgrad och kan förekomma samtidigt. Klassificeringen av observationerna är subjektiva och beror på personlig tolkning.

DATA OCH RAPPORTERING**Utvärdering av data**

Resultaten för korneal opacitet, svullnad och fluoresceinfärgning bör utvärderas separat för att ge en ICE-klass för varje endpoint. ICE-klasserna för varje endpoint kombineras därefter, så att man får en klassificering av varje testkemikalie med avseende på irritationsframkallande egenskaper.

Beslutsriterier

Efter att varje endpoint har utvärderats kan ICE-klasser tilldelas i enlighet med en på förhand fastställd skala. Tolkningen av hornhinnans svullnad (tabell 3), opacitet (tabell 4) och fluoresceinfärgning (tabell 5) med användning av fyra ICE-klasser görs enligt de skalor som visas nedan. Det är viktigt att notera att de värden för hornhinnans svullnad som anges i tabell 3 endast gäller om tjockleken mäts med en spaltlampa (t.ex. Haag-Streit BP900) med djupmätanordning nr 1 och spaltbredd på 9½, motsvarande 0,095 mm. Det är viktigt att vara medveten om att spaltlampan kan ge olika värden på hornhinnans tjocklek beroende på inställningen för spaltbredd.

Tabell 3

ICE-klassificeringskriterier för hornhinnans svullnad.

Medelvärde för svullnad (%) (*)	ICE-klass
0 till 5	I
> 5 till 12	II

Medelvärde för svullnad (%) (*)	ICE-klass
> 12 till 18 (> 75 min. efter behandling)	II
> 12 till 18 ($\leq$ 75 min. efter behandling)	III
> 18 till 26	III
> 26 till 32 (> 75 min. efter behandling)	III
> 26 till 32 ($\leq$ 75 min. efter behandling)	IV
> 32	IV

(*) Högsta medelvärde som observerats vid någon tidpunkt.

Tabell 4

ICE-klassificeringskriterier för opacitet.

Medelvärde för högsta opacitet (*)	ICE-klass
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–4,0	IV

(*) Högsta medelvärde som observerats vid någon tidpunkt (baserat på opacitetsvärden enligt tabell 1).

Tabell 5

ICE-klassificeringskriterier för fluoresceinfärgning.

Medelvärde för fluoresceinfärgning 30 minuter efter behandlingen (*)	ICE-klass
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–3,0	IV

(*) Baserat på poäng som anges i tabell 2.

Testkemikaliens övergripande klassificering in vitro bedöms genom avläsning av den GHS-klassificering som motsvarar kombinationen av kategorier för hornhinnan i fråga om svullnad, korneal opacitet och fluoresceinfärgning enligt beskrivningen i tabell 6.

Tabell 6

Övergripande in vitro-klassificeringar.

Klassificering enligt FN GHS	Kombinationer av tre endpoints
Ingen klassificering	3 × I 2 × I, 1 × II
Ingen förutsägelse kan göras	Andra kombinationer
Kategori 1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Korneal opacitet ≥ 3 vid 30 min. (minst två ögon) Korneal opacitet = 4 oavsett tidpunkt (minst två ögon) Kraftig avlossning av epitel (minst ett öga)

(*) Kombinationer som är mindre sannolika.

Kriterier för godkännande av ett försök

Testet anses godtagbart om de parallella negativa kontrollerna eller vehikel-/lösningsmedelskontrollerna och de parallella positiva kontrollerna identifieras som GHS ingen klassificering respektive GHS-kategori 1.

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande uppgifter i den mån de är relevanta:

Testkemikalie och kontrollkemikalier

- Kemisk beteckning såsom den strukturella beteckning som används i Chemical Abstracts Service (CAS) och eventuella andra kända beteckningar
- CAS-registernummer (RN), om det är känt.
- Test-/kontrollkemikaliers renhet och sammansättning (viktprocent) i den mån uppgifterna finns att tillgå.
- Fysikalisk-kemiska egenskaper, t.ex. fysikaliskt tillstånd, flyktighet, pH, stabilitet, kemisk klass och vattenlöslighet, i den mån de är relevanta.
- Behandling av test-/kontrollämnen före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).
- Stabilitet, om den är känd.

Uppgifter om sponsor och testanläggning

- Namn och adress för sponsor, testanläggning och försöksledare.
- Angivelse av ögonkällan (t.ex. den anläggning där ögonen togs till vara).

Testmetodens betingelser

- Beskrivning av testsystemet.

- Spallampa (t.ex. modell) och instrumentinställningar för detta.
- Hänvisning till historiska negativa och positiva kontrollresultat och, i förekommande fall, historiska data som visar godtagbara parallella intervaller för referenskontroller.
- Det förfarande som används för att säkerställa testmetodens integritet (dvs. noggrannhet och tillförlitlighet) över tiden (t.ex. periodisk testning med kvalifikationskemikalier).

Insamling och förberedelse av ögon

- Ålder och vikt för djuren och om möjligt, andra specifika egenskaper för de djur från vilka ögonen togs till vara.
- Lagrings- och transportförhållanden för ögonen (t.ex. datum och tidpunkt för insamling, tidsintervall mellan insamling av kycklinghuvuden och placering av de isolerade ögonen i superfusionskammaren).
- Förberedelse och montering av de ögon som använts, inbegripet utlåtanden om deras kvalitet, temperatur för ögonkammare samt urvalskriterier för de ögon som valts ut för testning.

Testförfarande

- Antal använda replikat.
- Uppgift om använda negativa och positiva kontroller (i förekommande fall även lösningsmedel och referenskontroller).
- Testkemikaliens dos, applicering och exponeringstid.
- Observationstidpunkter (före och efter behandling).
- Beskrivning av utvärderings- och beslutskriterierna.
- Beskrivning av acceptanskriterierna för undersökningen.
- Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet.

Resultat

- Data i tabellform över värden för svullnad av hornhinnan, opacitet och fluoresceinfärgning som erhållits för varje öga vid varje observationstidpunkt, inklusive medelvärden vid varje observationstidpunkt för samtliga testade ögon.
- Det högsta observerade medelvärdet för svullnad av hornhinnan, opacitet och fluoresceinfärgning (vid alla tidpunkter) samt relaterad ICE-klass.
- Beskrivning av eventuella andra observerade verkningar.
- Härledd in vitro GHS-klassificering.
- Fotografier av ögat, om det är lämpligt.

Diskussion av resultaten.

Slutsats

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. Finns på http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.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. Finns 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. Finns på <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>.
 - (4) Förenta nationerna (FN) (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), fjärde reviderade utgåvan, FN New York och Genève, 2011. Finns 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 nr 188 (del 1 och 2), OECD, Paris.
 - (6) Kapitel B.5 i denna bilaga, Akut ögonirritation/korrosion.
 - (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 nr 160, OECD, Paris.
 - (9) ICCVAM. (2006). Background review document: 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. Finns på http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm.
 - (10) Prinsen, M.K. och 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. Finns på <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>.
 - (12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. och 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. och 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. och Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Finns på <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>.
 - (17) Maurer, J.K., Parker, R.D. och 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 och R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.–Toxicol.*– 19, 471–480.
-

Tillägg 1

DEFINITIONER

Noggrannhet: Ett mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Den är ett mått på testmetodens prestanda och relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med "konkordans" för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (38).

Referenskemikalie: En kemikalie som används som en standard för jämförelse med en testkemikalie. En referenskemikalie bör ha följande egenskaper: i) en eller flera enhetliga och tillförlitliga källor, ii) strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas, iii) kända fysikalisk-kemiska egenskaper, iv) stödjande data om kända effekter och v) känd styrka inom det önskade responsområdet.

Botten-upp-strategi: stegvis metod som tillämpas på kemikalier som inte tros kräva klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada. Det första steget är att skilja kemikalier som inte behöver klassificeras (negativt utfall) från andra kemikalier (positivt utfall).

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Hornhinna (kornea): den transparenta delen på ögonglobens framsida som täcker iris och pupillen och släpper igenom ljus in i ögat.

Korneal opacitet: mått för den grad av opacitet som hornhinnan har efter exponering för en testkemikalie. Ökad korneal opacitet tyder på skador på hornhinnan.

Svullnad av hornhinnan: en objektiv mätning vid ICE-test av hur mycket hornhinnan sväller efter exponering för en testkemikalie. Den uttrycks som ett procenttal och beräknas utifrån ett grundvärde som fås vid mätning av hornhinnans tjocklek före exponering och den tjocklek som uppmäts med regelbundna intervaller efter exponering för testkemikalien. Graden av svullnad är en indikation på skadan på hornhinnan.

Ögonirritation: Ändringar som uppstår i ögat efter applicering av testkemikalien på ögats främre yta och som inte är fullt reversibla inom 21 dagar från appliceringen. Utbytbart mot "Reversibla effekter på ögat" och "GHS kategori 2" (4).

Falskt negativt värde: den andel av alla positiva ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som negativ. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

Falskt positivt värde: den andel av alla negativa (icke-aktiva) ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som positiva. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

Fluoresceinfärgning: en subjektiv mätning vid ICE-test av den mängd natriumfluorescein som hornhinnans epitelceller håller kvar efter exponering för ett testämne. Mängden fluorescein som hålls kvar är en indikation på skada på hornhinnan.

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

Irreversibla effekter på ögat: se "Allvarlig ögonskada" och "GHS kategori 1".

Blandning: En blandning eller en lösning som består av två eller flera ämnen i vilken de inte reagerar (4)

Negativ kontroll: ett obehandlat replikat som innehåller alla komponenter i ett testsystem. Detta prov hanteras tillsammans med testkemikaliebehandlade prover och andra kontrollprover för att avgöra huruvida lösningsmedlet påverkar testsystemet.

Ej klassificerad: Ämnen som inte är klassificerade som ögonirriterande (GHS-kategori 2) eller för allvarlig ögonskada (GHS-kategori 1). Utbytbart mot "GHS Ingen klassificering".

Positiv kontroll: ett replikat som innehåller testsystemets alla komponenter och behandlas med en kemikalie som veterligen inducerar positiv respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsens variationer kan bedömas över tiden, bör den kraftiga irritation som framkallas inte vara för stark.

Tillförlitlighet: mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när den utförs med hjälp av samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier och repeterbarheten inom laboratorier.

Irreversibla effekter på ögat: se "Ögonirritation" och "GHS kategori 2".

Allvarliga ögonskador: vävnadsskada i ögat eller kraftig synnedsättning som uppstår efter applicering av en testkemikalie på ögats främre yta och som inte är fullt reversibel inom 21 dagar från appliceringen (2). Utbytbart mot "Irreversibla effekter på ögat" och "GHS kategori 1" (4).

Spaltlampa: ett instrument som används för direkt undersökning av ögat under förstoring genom ett binokulärt mikroskop och som visar en stereoskopisk, topografisk bild. Vid ICE-test används instrumentet för att granska kycklingögats främre struktur och för objektiv mätning av hornhinnans tjocklek med tillbehöret för mätning av djup.

Lösningsmedels-/vehikelkontroll: ett obehandlat prov som innehåller testsystemets alla komponenter, inbegripet lösningsmedlet eller vehikeln som behandlas tillsammans med testkemikaliebehandlade prover och andra kontrollprover i syfte att fastställa bakgrundsrespons för de prover som behandlas med testkemikalien upplöst i samma lösningsmedel eller vehikel. När detta prov testas med en parallell negativ kontroll, visar provet också huruvida lösningsmedlet eller vehikeln påverkar testsystemet.

Ämne: kemiska grundämnen och deras föreningar i naturlig eller framställd form, inklusive eventuella tillsatser nödvändiga för att bevara produktens stabilitet och sådana föroreningar som härrör från framställningsprocessen, men exklusive eventuella lösningsmedel som kan avskiljas utan att det påverkar ämnets stabilitet eller ändrar dess sammansättning (4).

Ytaktivt ämne: Ett ämne, såsom ett rengöringsmedel, som kan minska en vätskas ytspänning så att lödder bildas eller fasta ämnen penetrerar. Även kallat tensid eller vätmedel.

Uppifrån och ned-strategi: stegvis metod som tillämpas på kemikalier som misstänks orsaka allvarlig ögonskada. Det första steget är att skilja kemikalier som inducerar allvarlig ögonskada (positiv utfall) från andra kemikalier (negativ utfall).

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

Stegvis testningsstrategi: en strategi för stegvis testning där all befintlig information om en testkemikalie granskas i en angiven ordning, med användning av förfarandet med sammanvägd bedömning (weight of evidence) för att avgöra om det finns tillräckligt med information till hands för att besluta om faroklassificering innan man går vidare till nästa steg. Om testkemikalien förmåga att framkalla irritation kan fastställas på grundval av befintlig information behövs ingen ytterligare testning. Om testkemikalien förmåga att framkalla irritation inte kan fastställas på grundval av befintlig information genomförs ett stegvis sekventiellt djurförsöksförfarande tills att det går att fastställa en otvetydig klassificering.

GHS (globalt harmoniserat system för klassificering och märkning av kemikalier): ett system för att klassificera ämnen och blandningar enligt standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker och informera om resultaten genom t.ex. piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad i syfte att informera om ämnens skadliga effekter för att skydda personer (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) och miljön (4).

GHS-kategori 1: se "Allvarlig ögonskada" och/eller "irreversibla effekter på ögat".

GHS-kategori 2: se "Ögonirritation" och eller "Reversibla effekter på ögat".

GHS Ingen kategori: Ämnen som inte uppfyller kraven för att klassificeras som GHS-kategori 1 eller 2 (2A eller 2B). Utbytbart mot "Ej klassificerad".

Validerad testmetod: en testmetod för vilken valideringsstudier har genomförts för att fastställa relevans (inbegripet noggrannhet) och tillförlitlighet för ett specifikt ändamål. Det är viktigt att notera att en validerad testmetod kanske inte är tillräckligt noggrann och tillförlitlig när det gäller ett visst föreslaget ändamål.

Sammanvägd bedömning: (weight of evidence) ett förfarande där man bedömer styrkor och svagheter hos flera uppgifter för att nå fram till och motivera en slutsats rörande en kemikalies faropotential.

Tillägg 2

KVALIFIKATIONSÄMNE FÖR ICE-TESTMETODEN

Före rutinanvändning av ett test som följer denna testmetod bör laboratoriet påvisa den tekniska kvaliteten genom att korrekt identifiera klassificeringen av kemikalier som är farliga för ögonen för de 13 kemikalier som rekommenderas i tabell 1. Dessa ämnen har valts ut att representera responsskalan för ämnen som är farliga för ögonen enligt resultaten från in vivo-test på kaninögon (TG 405) och FN:s GHS-klassificeringssystem (dvs. GHS-kategorierna 1, 2A, 2B eller ingen klassificering) (4)(6). Till övriga kriterier hör att ämnena ska vara kommersiellt tillgängliga, att det finns tillgång till in vivo-referensdata av hög kvalitet och att det finns data av hög kvalitet från ICE-testmetoden in vitro. Referensdata finns i SSD (5) och i ICCVAM Background Review Document för ICE-testmetoden (9).

Tabell 1

Rekommenderade kemikalier för att påvisa teknisk kvalitet med ICE-testmetoden

Kemikalie	CASRN	Kemisk klass ⁽¹⁾	Fysikalisk form	In vivo-klassificering ⁽²⁾	In vitro-klassificering ⁽³⁾
Bensalkoniumklorid (5 %)	8001-54-5	Oniumförening	Vätska	Kategori 1	Kategori 1
Klorhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Fast ämne	Kategori 1	Kategori 1
Dibensoyl-L-tartarsyra	2743-38-6	Karboxylsyra, ester	Fast ämne	Kategori 1	Kategori 1
Imidazol	288-32-4	Heterocyklisk förening	Fast ämne	Kategori 1	Kategori 1
Triklorättiksyra (30 %)	76-03-9	Karboxylsyra	Vätska	Kategori 1	Kategori 1
2,6-Diklorbensoyl-klorid	4659-45-4	Acylohalid	Vätska	Kategori 2A	Inga förutsägelser kan göras ⁽⁴⁾
Ammoniumnitrat	6484-52-2	Oorganiskt salt	Fast ämne	Kategori 2A ⁽⁵⁾	Inga förutsägelser kan göras ⁽⁴⁾
Etyl-2-metylacetoacetat	609-14-3	Keton, ester	Vätska	Kategori 2B	Inga förutsägelser kan göras ⁽⁴⁾
Dimetylsulfoxid	67-68-5	Organisk svavelförening	Vätska	Ingen klassificering	Ingen klassificering
Glycerol	56-81-5	Alkohol	Vätska	Ingen klassificering	Ingen klassificering (gränsfall)

Kemikalie	CASRN	Kemisk klass ⁽¹⁾	Fysikalisk form	In vivo-klassificering ⁽²⁾	In vitro-klassificering ⁽³⁾
Metylcyklopentan	96-37-7	Kolväte (cykliskt)	Vätska	Ingen klassificering	Ingen klassificering
n-hexan	110-54-3	Kolväte (acykliskt)	Vätska	Ingen klassificering	Ingen klassificering
Triacetin	102-76-1	Fett	Vätska	Inte klassificerad	Ingen klassificering

Förkortningar: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number

⁽¹⁾ Varje testkemikalie tilldelades en kemisk klass med användning av ett standardsystem baserat på klassificeringssystemet National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (finns på <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ På grundval av in vivo-test på kaninögon (OECD TG 405) och med användning av GHS (4)(6).

⁽³⁾ Baserat på resultat i ICE enligt beskrivningen i tabell 6.

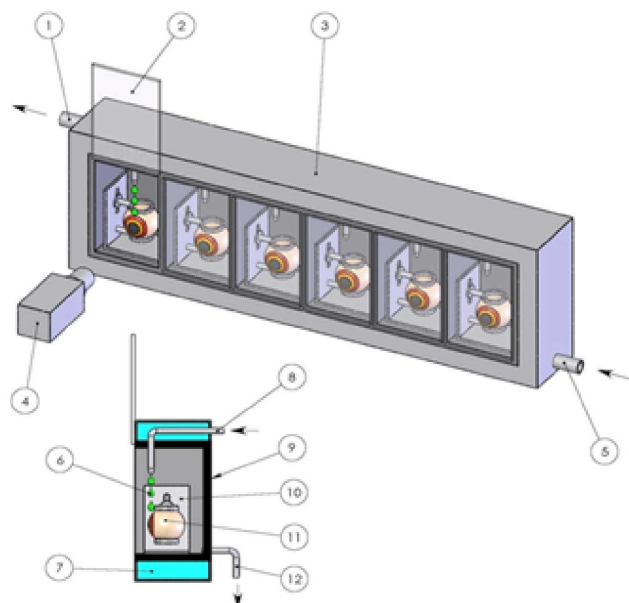
⁽⁴⁾ Kombination av andra ICE-värden än de som beskrivs i tabell 6 för identifiering av GHS ingen klassificering och GHS-kategori 1 (se tabell 6)

⁽⁵⁾ Klassificering i kategori 2B eller 2B beror på tolkningen av GHS-kriteriet för att skilja mellan dessa två kategorier, dvs. 1 av 3 jämfört med 2 av 3 djur med effekter på dag 7, vilket krävs för en klassificering i kategori 2A. In vivo-undersökningen omfattade tre djur. Alla resultatpunkter förutom rodnad konjunktiva hos ett djur återhämtades till noll dag 7 eller tidigare. Det djur som inte hade återhämtat sig fullständigt dag 7 hade en konjunktiv rodnad på 1 (dag 7) som var fullständigt återställd dag 10.

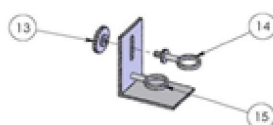
Tillägg 3

SUPERFUSIONSAPPARAT OCH ÖGONKLÄMMOR FÖR ICE-TESTMETODEN

(Se Burton m.fl. (18) för ytterligare allmänna beskrivningar av superfusionsapparaten och ögonklämmorna)
(18)



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Post nr	Beskrivning	Post nr	Beskrivning
1	Varmvattenutlopp	9	Fack
2	Skjutsdörr	10	Ögonhållare
3	Superfusionsapparat	11	Kycklingöga
4	Optiskt mätinstrument	12	Utgående koksaltlösning
5	Ingående varmvatten	13	Ställskruv
6	Saltlösning	14	Justerbar överarm
7	Varmvatten	15	Fast underarm"
8	Ingående koksaltlösning		

(14) I del B ska kapitel B.49 ersättas med följande:

”B.49 Mikrokärntest av däggdjursceller in vitro

INLEDNING

Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje 487 (2016). Den ingår i en serie testmetoder avseende genetisk toxikologi. Ett OECD-dokument som ger kortfattad information om tester inom genetisk toxikologi och en översikt över de senaste ändringarna av dessa testriktlinjer har utarbetats (1).

Mikrokärntest in vitro (MNvit) är ett genotoxicitetstest för att upptäcka mikrokärnor i cytoplasmat i interfasceller. Mikrokärnor kan härröra från acentriska kromosomfragment (dvs. en centromer saknas) eller från hela kromosomer som inte kan migrera till polerna under det anafasa steget av celldelningen. MNvit-testet är en in vitro-metod som ger tillgång till en omfattande bas för undersökning av kromosomskadepotentialen in vitro eftersom både aneugener och klastogener kan upptäckas (2) (3) i celler som har genomgått celldelning under eller efter exponering för testkemikalien (närmare uppgifter ges i punkt 13). Mikrokärnorna representerar skador som har förmedlats till dotterceller, medan kromosomavvikelser som detekteras i metafasceller inte alltid förmedlas. Cellen överlever inte alltid dessa förändringar.

Denna testmetod ger möjlighet att använda protokoll med och utan aktinpolymeriseringsinhibitorn cytochalasin B (cytoB). Tillsättning av cytoB före mitosen gör det möjligt att identifiera och analysera mikrokärnor endast i celler som har slutfört en mitos eftersom sådana celler är binukleära (4) (5). Denna testmetod gör det också möjligt att använda protokoll utan blockering av cytokines, förutsatt att det finns belägg för att den analyserade cellpopulationen har genomgått mitos.

Utöver MNvit-testet för att identifiera kemikalier som inducerar mikrokärnor kan man även använda immunokemisk märkning av kinetokorer eller hybridisering med centromeriska/telomeriska prober (FISH-teknik, Fluorescens In Situ Hybridisation) för att få ytterligare information om mekanismerna för kromosomskador och bildningen av mikrokärnor (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Dessa märknings- och hybridiseringsförfaranden kan användas när det förekommer ökad bildning av mikrokärnor och man vill slå fast om ökningen är resultatet av klastogena och/eller aneugena händelser.

Eftersom mikrokärnor i interfasceller kan bedömas relativt objektivt behöver laboratoriepersonalen bara bestämma antalet binukleära celler om cytoB används. Förekomsten av celler med mikrokärnor i ska bestämmas samtliga fall. Detta innebär att utstryksglasen kan klassificeras relativt snabbt och analysen kan automatiseras. Det är därför praktiskt att klassificera tusentals i stället för hundratals celler per behandling, vilket ökar testets styrka. Eftersom mikrokärnor kan uppstå från isolerade kromosomer finns det också möjlighet att detektera aneuploidiframkallande ämnen som är svåra att undersöka genom konventionella kromosomavvikelsestest, t.ex. Kapitel B.10 i denna bilaga (18). MNvit-testet som det beskrivs i denna testmetod ger dock inte möjlighet att utan särskilda tekniker såsom FISH (se punkt 4) skilja mellan kemikalier som inducerar ändringar av kromosomantalet och/eller polyploiditet från sådana kemikalier som inducerar klastogenicitet.

MNvit-testet är robust och kan utföras på ett flertal celltyper, med eller utan tillsats av cytoB. Det finns omfattande data som underbygger giltigheten av MNvit testet med användning av olika celltyper (odlingar av cellinjer eller primära cellkulturer) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Dessa data kommer bland annat från internationella valideringsstudier samordnade av *Société Française de Toxicologie Génétique* (SFTG) (19) (20) (21) (22) (23) och rapporter från *International Workshop on Genotoxicity Testing* (5) (17). Tillgängliga data har också omvaliderats i en retrospektiv sammanvägd (weight-of-evidence) valideringsstudie vid Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (ECVAM), och testmetoden har erkänts som vetenskapligt giltig av ECVAM:s vetenskapliga rådgivande kommitté (ESAC) (37) (38) (39).

MNvit-testet på däggdjursceller kan göras med kulturer av cellinjer eller primära cellkulturer från människor eller gnagare. Eftersom bakgrundsfrekvensen av mikrokärnor påverkar testets känslighet, rekommenderas att man använder celltyper med en stabil och definierad bakgrundsfrekvens av mikrokärnbildning. De celler som används bör väljas ut på grundval av god tillväxtförmåga vid odling, karyotypens stabilitet (inklusive antalet kromosomer) och den spontana frekvensen av mikrokärnor (40). De uppgifter som finns tillgängliga för närvarande tillåter inte bestämda rekommendationer, men de tyder på att det i utvärderingen av kemiska faror är viktigt att överväga p53-status, genetisk stabilitet (karyotyp) samt DNA-cellernas återhämtningskapacitet och ursprung (gnagare jämfört med människa) hos de celler som väljs ut för testning. Om denna testmetod används bör man överväga hur dessa och andra cellegenskaper inverkar på en cellinjes förmåga att upptäcka induktionen av mikrokärnor, allteftersom kunskapen utvecklas på detta område.

Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

För testning in vitro krävs i regel ett exogent system för metabolisk aktivering, om cellerna inte är metaboliskt kompetenta i fråga om de kemikalier som testas. Det exogena metaboliska aktiveringssystemet efterliknar inte helt förhållandena in vivo. Man bör se till att undvika sådana förhållanden som leder till artefaktiska positiva resultat som inte avspeglar testkemikaliernas gentoxicitet. Sådana förhållanden omfattar ändringar av pH (41) (42) (43) eller osmolalitet, interaktion med cellodlingsmediet (44) (45) eller överdrivet höga nivåer av cytotoxicitet (se punkt 29).

För analysen av induktion av mikrokärnor är det av central betydelse att mitosen har inträffat i både de behandlade och obehandlade odlingarna. Det mest informativa stadiet för detektering av mikrokärnor är när cellerna har slutfört en mitos under eller efter behandling med testkemikalien. Tillverkade nanomaterial kräver särskilda anpassningar av testmetoden, men de beskrivs inte här.

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

TESTPRINCIP

Cellodlingar från människa eller andra däggdjur exponeras för testkemikalien både med och utan ett exogent metaboliskt aktiveringssystem, utom om de celler som används har tillräcklig metaboliserande kapacitet (se punkt 19).

Under eller efter exponering för testkemikalien odlas cellerna tillräckligt länge för att kromosomskador eller andra effekter på cellcykeln/celldelningen ska leda till att mikrokärnor bildas i interfascellerna. För induktion av aneuploidi bör testkemikalien i regel finnas närvarande under mitosen. Interfascellerna skördas och färgas in och närvaron av mikrokärnor analyseras. Idealiskt sett bör man för detekteringen av mikrokärnor endast använda celler som har slutfört mitosen under exponeringen för testkemikalien eller under perioden efter behandlingen, om en sådan används. I odlingar som har behandlats med en cytokinesinhibitor uppnås detta enkelt genom att endast analysera binukleära celler. Om blockering av cytokines inte används är det viktigt att påvisa att de analyserade cellerna sannolikt har genomgått celldelning, baserat på en ökning av cellpopulationen, under eller efter exponeringen för testkemikalien. Oavsett protokoll är det viktigt att påvisa att cellproliferation har skett både i kontrollodlingarna och de behandlade odlingarna, och omfattningen av testkemikalieinducerad cytotoxicitet eller cytostas ska bedömas i alla odlingar som är föremål för analys av mikrokärnor.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Celler

Man kan använda odlade primära perifera blodlymfocyter från människa eller andra däggdjur (7) (20) (46) (47) och celler från ett antal gnagarcellinjer såsom CHO, V79, CHL/IU och L5178Y (19) (20) eller humana cellinjer såsom TK6 (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (se punkt 6). Andra cellinjer, såsom HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), HepG2-celler (52) (53), A549 och primära embryoceller från syrisk hamster (54) har använts för testning av mikrokärnor, men har inte genomgått en omfattande validering ännu. Användning av dessa cellinjer och celltyper bör därför motiveras på grundval av deras påvisade prestanda i testet enligt beskrivningen i avsnittet om kriterier för godkännande. Cyto B rapporterades potentiellt påverka celltillväxten för L5178Y och rekommenderas inte för denna cellinje (23). Om primära celler används av djurskyddsskäl bör man när så är möjligt överväga användning av celler med mänskligt ursprung som samlas in enligt humana etiska principer och regler.

Humana perifera blodlymfocyter bör tas från unga rökfria personer (cirka 18–35 år) utan kända sjukdomar som inte nyligen har exponerats för genotoxiska agens (t.ex. kemikalier, joniserande strålning) vid nivåer som skulle öka den bakomliggande incidensen av celler med mikrokärnor. Detta garanterar att den bakomliggande incidensen av celler med mikrokärnor är låg och konstant. Förekomsten av celler med mikrokärnor ökar med åldern och denna tendens är mer markerad hos kvinnor än hos män (55). Om celler från fler än en givare poolas för användning bör antalet givare anges. Man måste kunna påvisa att cellerna har delat sig från det att behandlingen med testkemikalien påbörjades fram till provtagningen av cellerna. Cellodlingarna hålls i en exponentiell tillväxtfas (cellinjer) eller stimuleras så att de delar sig (primära lymfocytodlingar). Syftet med detta är att exponera cellerna i olika stadier av cellcykeln eftersom cellstadiernas sensitivitet för testkemikalierna kanske inte är känd. De primära celler som måste stimuleras med mitogena agens för att dela sig är i regel inte längre synkroniserade under exponeringen för testkemikalien (t.ex. humana lymfocyter efter mitogenisk stimulans i 48 timmar). Användning av synkroniserade celler under behandling med testkemikalien rekommenderas inte, men kan vara godtagbar om det är motiverat.

Medier och odlingsbetingelser

Lämpliga odlingsmedier och inkubationsförhållanden (odlingskärl, luftfuktighet på 5 % CO₂ i förekommande fall, en temperatur på 37 °C) bör väljas för odlingarna. Cellinjer bör rutinmässigt kontrolleras med avseende på det modala kromosomantalets stabilitet och frånvaro av kontaminerad mykoplasma, och cellerna får inte användas om kontamination har skett eller om det modala kromosomantalet har ändrats. Cellernas normala cellcykeltid eller den normala cellcykeltiden hos de primära kulturer som används i testlaboratoriet bör fastställas och bör överensstämma med kända cellegenskaper.

Beredning av odlingarna

Cellinjer: celler dras upp från stamkulturer, sås ut i ett odlingsmedium som har en sådan densitet att celler i suspension eller monolager fortsätter att växa exponentiellt fram till skörd (konfluens av celler som växer i monolager bör undvikas).

Lymfocyter: helblod, behandlat med en antikoagulant (t.ex. heparin), eller separerade lymfocyter odlas (t.ex. 48 timmar för humana lymfocyter) i närvaro av ett mitogen (t.ex. fytohemagglutinin [PHA] för humana lymfocyter) för att framkalla celledelning innan cellerna exponeras för testkemikalien och cytoB.

Metabolisk aktivering

Exogena metaboliserande system bör användas när cellerna inte har tillräcklig endogen metabolisk kapacitet. Det mest använda systemet, som rekommenderas som standard om inte annat kan motiveras, är en kofaktorstött post-mitokondriell fraktion (S9) beredd ur lever från gnagare (vanligen råttor) som behandlats med enzyminducerande ämnen såsom Aroclor 1254 (56) (57) eller en kombination av fenobarbital och b-naftoflavon (58) (59) (60). Den senare kombinationen bryter inte mot Stockholmskonventionen om långlivade organiska föroreningar (61) och har visat sig vara lika effektiv som Aroclor 1254 när det gäller att inducera monooxygenaser ("mixed-function oxidases") (58) (59) (60). S9-fraktionen används vanligen i koncentrationer mellan 1–2 volymprocent men kan ökas till 10 volymprocent i det slutliga testmediet. Användning av produkter som minskar det mitotiska indexet, särskilt kalciumkomplexprodukter (62), bör undvikas under behandlingen. Valet av typ och koncentration av använt exogent metaboliskt aktiveringssystem eller metabolisk induktion kan påverkas av den kemikalieklass som testas.

Beredning av testkemikalien

Fasta testkemikalier bör beredas med lämpliga lösningsmedel och vid behov spädas ut innan cellerna behandlas. Flytande testkemikalier kan tillsättas direkt till testsystemet och/eller spädas ut före behandling av testsystemet. Gaser eller flyktiga testkemikalier bör testas genom lämpliga modifikationer av standardprotokollen, såsom behandling i slutna kärl (63) (64) (65). Testkemikalien bör beredas strax innan behandling om inte stabilitetsdata visar att lagringen är acceptabel.

Testbetingelser

Lösningsmedel

Man bör välja ett lösningsmedel som optimerar testkemikaliens löslighet utan att testet påverkas negativt, t.ex. genom förändringar i celltillväxten som påverkar testkemikaliens integritet, reaktion med odlingskärnen eller försämrad metabolisk aktivering. När det är möjligt, rekommenderas att man i första hand överväger vattenbaserade lösningsmedel (eller odlingsmedier). Vedertagna lösningsmedel är vatten eller dimetylsulfoxid (DMSO). Organiska lösningsmedel bör i regel inte överstiga 1 volymprocent. Om cytoB löses upp i DMSO får den totala mängden organiskt lösningsmedel som används för både testkemikalien och cytoB inte överstiga 1 volymprocent. I annat fall bör obehandlade kontroller användas för att se till att procentandelen organiskt lösningsmedel inte ger en negativ effekt. Vattenhaltiga lösningsmedel (saltlösningar eller vatten) bör inte överstiga 10 volymprocent i det slutliga behandlingsmediet. Om man använder lösningsmedel som inte är vedertagna (t.ex. etanol eller aceton) bör detta stödjas av uppgifter om att de är förenliga med testkemikalierna och testsystemet och att de inte är genetiskt toxiska vid den använda koncentrationen. Om ett sådant underlag saknas är det viktigt att inkludera obehandlade kontroller (se tillägg 1) och lösningsmedelskontroller som påvisar att inga skadliga effekter eller kromosomeffekter (t.ex. aneuploidi eller klastogenitet) induceras av det valda lösningsmedlet.

Användning av cytoB som cytokinesinhibitor

En av de viktigaste faktorerna när det gäller MNvit-testets resultat är att se till att de celler som analyseras har slutfört mitosen under behandlingen eller under eventuell inkubationsperiod efter behandlingen. Analysen av binukleära celler bör då begränsas till celler som har genomgått mitos under eller efter behandlingen. CytoB är det ämne som oftast används för blockering av cytokines eftersom det hindrar aktinbildning och således hindrar separationen av dotterceller efter mitosen så att binukleära celler kan bildas (6) (66) (67). Samtidigt kan man mäta testkemikalens effekt på cellproliferationskinetiken när cytoB används. CytoB ska användas som cytokinesinhibitor när humana lymfocyter används eftersom cellcykeltiderna varierar mellan givare och eftersom inte alla lymfocyter ger respons på PHA-stimulans. CytoB är inte obligatoriskt för andra celltyper om det kan fastställas att de har genomgått uppdelning enligt beskrivningen i punkt 27. CytoB används normalt inte när proverna utvärderas med avseende på mikrokärnor med användning av flödescytometrisk metod.

Laboratoriet bör fastställa lämplig koncentration av cytoB för varje celltyp i syfte att nå optimal förekomst av binukleära celler i kontrollodlingarna för lösningsmedel/vehikel och bör visa att det kan producera en tillräcklig mängd binukleära kärnor för klassificering. Lämplig cytoB-koncentration är i regel 3–6 µg/ml (19).

Mätning av cellproliferation och cytotoxicitet och val av exponeringskoncentrationer

Vid bestämning av den högsta testkemikaliekoncentrationen ska man undvika koncentrationer som kan ge artefaktiska positiva resultat, t.ex. för kraftig cytotoxicitet (se punkt 29), utfällning i odlingsmediet (se punkt 30) och markerade ändringar av pH eller osmolalitet (se punkt 9). Om testkemikalien orsakar en markerad ändring av pH i mediet vid tillsättnings tidpunkten kan pH justeras, företrädesvis genom buffring av det slutliga behandlingsmedlet för att undvika artefaktiska positiva resultat och upprätthålla lämpliga odlingsförhållanden.

Cellproliferationen bör mätas för att se till att tillräckligt många behandlade celler har genomgått mitos under testet och att behandlingarna görs på lämpliga nivåer av cytotoxicitet (se punkt 29). Cytotoxicitet bör fastställas med och utan metabolisk aktivisering i huvudförsöket med hjälp av lämplig indikation på celldöd och tillväxt (se punkterna 26 och 27). Även om det kan vara användbart att utvärdera cytotoxicitet i ett preliminärt test för att bättre definiera de koncentrationer som ska användas i huvudförsöket är ett preliminärt test inte obligatoriskt. Om ett preliminärt test utförs bör det inte ersätta mätning av cytotoxicitet i huvudförsöket.

Behandling av odlingarna med cytoB och mätning av de relativa frekvenserna av mononukleära, binukleära och multinukleära celler i odlingen är en noggrann metod för kvantifiering av effekten på cellproliferationen och behandlingens cytotoxiska eller cytostatiska aktivitet (6) och säkerställer att endast celler som har delat sig under eller efter behandlingen analyseras mikroskopiskt. CBPI (Cytokinesis-Block Proliferation Index) (6) (27) (68) eller replikeringsindex (RI) från minst 500 celler per odling (se tillägg 2 för formler) rekommenderas för att uppskatta behandlingens cytotoxiska eller cytostatiska aktivitet genom en jämförelse av värdena i de behandlade odlingarna och kontrollodlingarna. Bedömning av andra indikatorer på cytotoxicitet (t.ex. cellernas integritet, apoptos, nekros, antalet metafaser, men bör inte användas i stället för CBPI eller RI).

I studier utan cytoB är det nödvändigt att påvisa att cellerna i odlingen har genomgått delning, så att en avsevärd andel av de klassificerade cellerna har genomgått delning under eller efter behandling med testkemikalien. Annars kan man få falsk negativ respons. Mätning av relativ populationsfördubbling (RPD) eller relativ ökning av celltal (RICC) rekommenderas för att uppskatta den cytotoxiska eller cytostatiska aktiviteten i behandlingen (17) (68) (69) (70) (71) (se tillägg 2 för formler). Vid förlängda provningstider (t.ex. behandling för 1,5–2 gånger den normala cellcykelns längd och skörd efter ytterligare 1,5–2 gånger den normala cellcykelns längd som leder till provtagningstider som är längre än totalt 3–4 normala cellcykellängder enligt beskrivningen i punkterna 38 och 39) kan cytotoxiciteten underskattas med RPD (71). Under dessa omständigheter kan RICC vara ett bättre mått. Det kan också vara användbart att utvärdera utvecklingen av cytotoxicitet efter 1,5–2 gånger den normala cellcykelns längd. Bedömning av andra markörer för cytotoxicitet eller cytostas (t.ex. cellintegritet, apoptos, nekros, antalet metafaser, proliferationsindex (PI), cellcykel, nukleoplasmabryggor eller nukleära knoppar kan ge värdefull information, men bör inte användas i stället för RPD eller RICC.

Minst tre testkoncentrationer (exklusive lösningsmedel och positiva kontroller) som uppfyller acceptanskriterierna (lämplig cytotoxicitet, antal celler osv.) bör utvärderas. Oavsett celltyp (cellinjer eller primära odlingar av lymfocyter) kan antingen replikat eller så kan enstaka behandlade kulturer användas för varje testad koncentration. Två odlingar rekommenderas, men enstaka odlingar är också godtagbara under förutsättning att samma totala antal celler registreras för antingen enstaka eller dubbla kulturer. Användningen av en enstaka odling är särskilt relevant när fler än tre koncentrationer bedöms (se punkterna 44–45). De resultat som erhöles i de oberoende replikatodlingarna vid en given koncentration kan slås ihop för dataanalysen. För testkemikalier med låg eller ingen cytotoxicitet är två- till trefaldiga koncentrationsintervaller vanligen lämpliga. Där cytotoxicitet uppträder bör de valda testkoncentrationerna omfatta intervallet från att producera cytotoxicitet som beskrivs i punkt 29 och inkludera koncentrationer vid vilka det är måttlig och liten eller ingen cytotoxicitet. Många testkemikalier uppvisar koncentrationsresponskurvor. För att få uppgifter vid låg och måttlig cytotoxicitet eller undersöka dos-responsförhållandet i detalj är det därför nödvändigt att använda mer nära varandra liggande koncentrationer och/eller fler än tre koncentrationer (enstaka kulturer eller replikat) i situationer där försöket måste upprepas (se punkt 60).

Om den maximala koncentrationen baseras på cytotoxicitet bör den högsta koncentrationen syfta till att uppnå 55 ± 5 % cytotoxicitet med hjälp av de rekommenderade cytotoxicitetsparametrarna (dvs. minskning av RICC och RPD för cellinjer när cytoB inte används och minskning av CBPI eller RI när cytoB används till 45 ± 5 % av den parallella negativa kontrollen) (72). Man bör vara försiktig i tolkningen av positiva resultat som endast återfinns i den övre delen av detta cytotoxicitetsintervall på 55 ± 5 % (71).

För svårslösliga testkemikalier som inte är cytotoxiska vid koncentrationer som är lägre än den lägsta olösliga koncentrationen bör den högsta analyserade koncentrationen framkalla grumlighet eller en fällning som är synlig med blotta ögat eller med hjälp av ett inverterat mikroskop vid slutet av behandlingen med testkemikalien. Även om cytotoxicitet förekommer över den lägsta olösliga koncentrationen är det lämpligt att testa endast en koncentration som inducerar grumlighet eller har en synlig fällning, eftersom fällningen kan ge artefaktiska effekter. När det gäller koncentrationer som ger fällningar bör man se till att detta inte stör testet (t.ex. färgning eller bestämning). Bestämning av löslighet i odlingsmediet före försöket kan vara användbart.

Om ingen cytotoxicitet eller utfällning observeras ska de högsta testkoncentrationerna motsvara 10 mM, 2 mg/ml eller 2 µl/ml, enligt det som är lägst (73) (74) (75). Om testkemikalien inte har en definierad sammansättning, t.ex. ett ämne med okänd eller variabel sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiskt material (UVCB) (76), miljöextrakt osv., kan man behöva använda en högre toppkoncentration (t.ex. 5 mg/ml) om inte cytotoxiciteten är tillräckligt hög så att koncentrationen för varje komponent ökas. Det bör dock noteras att dessa krav kan skilja sig för humanläkemedel (93).

Kontroller

Parallella negativa kontroller (se punkt 21), bestående av lösningsmedel eller enbart en vehikel i behandlingsmediet, och hanterade på samma sätt som behandlingsodlingarna, bör inkluderas var gång som odlingen skördas.

Parallella positiva kontroller behövs för att visa laboratoriets förmåga att identifiera klastogener och aneugener enligt villkoren i det använda testprotokollet och, i förekommande fall, effektiviteten hos det exogena systemet för metabolisk aktivering. Exempel på positiva kontroller ges i tabell 1 nedan. Alternativa positiva kontrollkemikalier kan användas om det är motiverat.

För närvarande känner man inte till några aneugener som kräver metabolisk aktivering för sin genotoxiska aktivitet (17). Tester in vitro av däggdjursceller med avseende på genetisk toxicitet är tillräckligt standardiserade för de kortvariga behandlingar som görs parallellt med och utan metabolisk aktivering med samma behandlingstid. Användningen av positiva kontroller kan därför begränsas till en klastogen som kräver metabolisk aktivering. I detta fall visar en enda klastogen positiv kontrollrespons både aktiviteten hos det metaboliska aktiveringssystemet och testsystemets responsivitet. Separata positiva kontroller bör dock göras av långvariga behandlingar (utan S9) eftersom behandlingstiden skiljer sig från tester med metabolisk aktivering. Om en klastogen används som den enda positiva kontrollen för en kortvarig behandling med eller utan metabolisk aktivering bör en aneugen väljas för den långvariga behandlingen utan metabolisk aktivering. Positiva kontroller för både klastogenicitet och aneugenicitet bör användas för metaboliskt kompetenta celler som inte kräver S9.

Varje positiv kontroll bör användas för en eller flera koncentrationer som förväntas ge öknings över bakgrunden som går att reproducera och detektera. Syftet med detta är att visa testsystemets sensitivitet (dvs. verkningarna är tydliga men avslöjar inte omedelbart identiteten hos de kodade utstryksglasen för avläsaren), och responsen får inte äventyras av cytotoxicitet som överskrider de gränser som anges i testmetoden.

Tabell 1

Rekommenderade referenskemikalier för utvärdering av laboratoriets kompetens att välja positiva kontroller.

Kategori	Kemikalie	CASRN
1. Klastogener utan metabolisk aktivering		
	Metylmetansulfonat	66-27-3
	Mitomycin C	50-07-7
	4-nitrokinolin-N-oxid	56-57-5
	Cytosinarabinosid	147-94-4
2. Klastogener som kräver metabolisk aktivering		
	Benzo(a)pyren	50-32-8
	Cyklofosfamid	50-18-0

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

FÖRFARANDE

Behandlingsschema

För att maximera sannolikheten för att detektera en aneugen eller klastogen som agerar i ett visst skede av cellcykeln är det viktigt att ett tillräckligt antal celler som representerar alla de olika skedena i cellcykeln behandlas med testkemikalien. Alla behandlingar bör inledas och avslutas medan cellerna växer exponentiellt och cellerna bör fortsätta att växa fram till provtagningen. Behandlingsschemat för cellinjer och primära cellodlingar kan därför avvika något från behandlingsschemat för lymfocyter som kräver mitogen stimulering för att inleda sin cellcykel (17). För lymfocyter är det effektivast att inleda behandlingen med testkemikalien 44–48 timmar efter PHA-stimulering, när cellerna delar sig på ett asynkront sätt (6).

Offentliggjorda data (19) tyder på att de flesta aneugener och klastogener detekteras med en kortvarig behandlingsperiod på 3–6 timmar med och utan tillsats av S9, åtföljd av borttagning av testkemikalien och provtagning vid en tidpunkt som motsvarar ungefär 1,5–2,0 gånger den normala cellcykelns längd efter inledandet av behandlingen (7).

För en grundlig utvärdering, vilket krävs för en slutsats om ett negativt resultat, bör dock samtliga tre försöksförhållanden som anges nedan tillämpas i en korttidsbehandling med och utan metabolisk aktivering samt en långtidsbehandling utan metabolisk aktivering (se punkterna 56, 57 och 58):

- Cellerna bör exponeras för testkemikalien utan metabolisk aktivering, under 3–6 timmar och prov bör tas ut vid en tid som motsvarar cirka 1,5–2,0 gånger den normala cellcykelns längd efter det att behandlingen har påbörjats (19).
- Celler bör exponeras för testkemikalien med metabolisk aktivering i 3–6 timmar, och provtas vid en tidpunkt som motsvarar cirka 1,5–2,0 gånger den normala cellcykelns längd efter behandlingens början (19),
- Cellerna bör exponeras kontinuerligt utan metabolisk aktivering tills provtagning under en tidsperiod som motsvarar cirka 1,5–2,0 gånger de normala cellcykellängderna.

Om något av de ovannämnda försöksförhållandena leder till en positiv respons kan andra behandlingssystem behöva övervägas.

Om det är känt eller man misstänker att testkemikalien påverkar cellcykellängden (t.ex. vid testning av nukleosidanaloger), särskilt för p53-kompetenta celler (35) (36) (77), kan provtagnings- eller återhämtningstiderna förlängas med upp till ytterligare 1,5–2,0 gånger den normala cellcykelns längd (dvs. totalt 3,0–4,0 gånger den normala cellcykelns längd efter inledandet av kort- och långvariga behandlingar). Dessa alternativ gäller för situationer där det kan finnas tvivel rörande eventuell växelverkan mellan testkemikalien och cytoB. Om förlängda provtagningstider används (dvs. totalt 3,0–4,0 gånger den normala cellcykelns längd) är det viktigt att säkerställa att cellerna fortfarande aktivt delar på sig. Lymfocyters exponentiella tillväxt kan t.ex. minska vid 96 timmar efter stimulering och celler som växer i monolager kan bli konfluenta.

Förslag till cellbehandlingsscheman sammanfattas i tabell 2. Dessa allmänna behandlingsscheman kan modifieras (och bör motiveras) beroende på testkemikalien stabilitet eller reaktivitet eller de särskilda tillväxtegenskaper som gäller för de celler som används.

Tabell 2

Tidpunkter för cellbehandling och skörd när MNvit-testet används

Lymfocyter, primära celler och cellinjer behandlade <u>med</u> cytoB	+ S9 Kort behandling	Behandla 3–6 timmar med tillsats av S9, avlägsna S9 och behandlingsmedium, tillsätt färskt medium och cytoB, skörda efter 1,5–2,0 normala cellcykler efter inledandet av behandlingen.
	– S9 Kort behandling	Behandla 3–6 timmar, avlägsna behandlingsmedium, tillsätt färskt medium och cytoB, skörda efter 1,5–2,0 normala cellcykler efter inledandet av behandlingen.
	– S9 Utvidgad behandling	Behandla under 1,5–2 normala cellcykellängder med tillsats av cytoB, skörda i slutet av behandlingsperioden.

Cellinjer som behandlas utan cytoB
(samma som de behandlingsscheman som anges ovan utom att cytoB inte tillsätts)

I monolagerodlingar kan det finnas mitotiska celler (som identifieras genom att de är runda och lösgör sig från ytan) i slutet av behandlingen på 3–6 timmar. Eftersom dessa mitotiska celler enkelt lösgörs, kan de förloras när mediet som innehåller testkemikalien avlägsnas. Om det finns bevis för en betydande ökning av antalet mitotiska celler jämfört med kontrollerna, vilket tyder på en sannolik mitotisk hämning, bör cellerna samlas in genom centrifugering och tillsättas till odlingarna igen, så att man undviker risken att förlora celler i mitos och risken för mikrokärn-/kromosomavvikelse vid skördetidpunkten.

Skörd av celler och beredning av utstryksglas

Varje odling bör skördas och hanteras separat. Cellerna kan förberedas med hypoton behandling, men detta steg är inte nödvändigt om lämplig cellspredning kan åstadkommas på annat sätt. Olika tekniker kan användas för beredningen av utstryksglasen, förutsatt att cellberedningar av hög kvalitet för klassificeringen erhålls. Celler med intakta cellmembran och cytoplasma bör behållas för att ge möjlighet att detektera mikrokärnor och (vid metoden med blockering av cytokines) tillförlitlig identifiering av binukleära celler.

Utstryksglasen kan färgas med olika metoder, såsom Giemsa eller fluorescerande DNA-specifika färgämnen. Användningen av lämplig fluoresceinfärgning (t.ex. akridinorange (78) eller Hoechst 33258 plus pyronin-Y (79)) kan eliminera några av de artefakter som är associerade med användning av ett färgämne som inte är DNA-specifikt. Anti-kinetokor-antikroppar, FISH-teknik med pancentromera DNA-prober eller primad in situ-märkning med pancentromerspecifik primer, tillsammans med lämplig DNA-motfärgning kan användas för att identifiera innehållet (hela kromosomer färgas medan acentriska kromosomfragment inte färgas) av mikrokärnor om man är intresserad av mekanismer för hur de bildas (16) (17). Andra metoder för differentiering mellan klastogener och aneugener kan användas om de har visat sig vara effektiva och är validerade. För vissa cellinjer kan t.ex. mätningar av kärnor av typen sub-2N som hypodiploida händelser med hjälp av tekniker som bildanalys, laserskanningcytometri eller flödescytometri också ge användbar information (80) (81) (82). Morfologiska observationer av kärnor kan också ge indikationer på eventuell aneuploidi. Ett test avseende metafase-kromosomavvikelser, företrädesvis av samma celltyp och protokoll med jämförbar sensitivitet, kan också vara ett användbart sätt att avgöra om mikrokärnorna beror på kromosombrott (med vetskap om att kromosomförlust inte upptäcks i testet avseende kromosomavvikelser).

Analys

Alla utstryksglas, inklusive glasen från lösningsmedelskontrollerna och de obehandlade kontrollerna (om sådana används) samt de positiva kontrollerna, bör ges en oberoende kodning före mikroskopanalysen av mikrokärnornas frekvenser. Om ett automatiskt klassificeringssystem används bör lämpliga tekniker tillämpas för att kontrollera eventuella avvikelser eller drift, t.ex. flödescytometri, laserskanningcytometri eller bildanalys. Oavsett om en automatisk plattform används för att räkna mikrokärnorna, bör CBPI, RI, RPD eller RICC bedömas samtidigt.

I cytoB-behandlade odlingar bör mikrokärnornas frekvenser analyseras i minst 2 000 binukleära celler per koncentration och kontroll (83), lika fördelade mellan replikaten om sådana används. När det gäller enstaka odlingar per dos (se punkt 28) bör åtminstone 2 000 binukleära celler per odling (83) klassificeras i den enstaka odlingen. Om betydligt mindre antal än 1 000 binukleära celler per odling (för dubbla odlingar), eller 2 000 (för enstaka odlingar) finns att tillgå för analys för varje koncentration och en väsentlig ökning av mikrokärnor inte upptäcks, bör testet upprepas med användning av flera celler eller vid mindre cytotoxiska koncentrationer, enligt det som är lämpligt. Man bör vara noga med att inte klassificera binukleära celler med oregelbundna former eller om de två kärnorna skiljer sig betydligt i storlek. Dessutom får binukleära celler inte sammanblandas med dåligt spridda flerkärniga celler. Celler som innehåller fler än två huvudkärnor bör inte analyseras för mikrokärnor, eftersom grundvärdet för mikrokärnornas frekvenser kan vara högre i dessa celler (84). Klassificering av enkärniga celler är godtagbart om testkemikalien har visat sig störa cytoB-aktiviteten. I sådana fall kan ett upprepat test utan cytoB vara användbart. Klassificering av enkärniga celler förutom binukleära celler kan ge användbar information (85) (86), men är inte obligatoriskt.

I cellinjer som testas utan cytoB-behandling bör mikrokärnorna klassificeras i minst 2 000 celler per testkoncentration och kontroll (83), lika fördelade mellan replikaten om sådana används. Om enstaka odlingar används per koncentration (se punkt 28) bör minst 2 000 celler per odling klassificeras i den enstaka odlingen. Om betydligt mindre antal än 1 000 celler per odling (för dubbla odlingar), eller 2 000 (för enstaka odlingar) finns att tillgå för analys för varje koncentration och en väsentlig ökning av mikrokärnor inte upptäcks, bör testet upprepas med användning av flera celler eller vid mindre cytotoxiska koncentrationer, enligt det som är lämpligt.

När cytoB används bör proliferationsindex vid cytokinesinhibering (CBPI) eller replikeringsindex (RI) bestämmas för bedömning av cellproliferationen (se tillägg 2) med användning av minst 500 celler per odling. När behandlingar görs utan tillsats av cytoB är det väsentligt att belägg ges för att cellerna i odlingen har delats, enligt beskrivningen punkterna 24–28.

Laboratoriets kompetens

För att fastställa att det finns tillräcklig erfarenhet av testet innan det används för rutintestning bör laboratoriet ha utfört en serie försök med positiva referenskemikalier som agerar via olika mekanismer (åtminstone ett med och ett utan metabolisk aktivering och ett som agerar via en aneugenisk mekanism, valt från kemikalierna i tabell 1) och flera negativa kontroller (inklusive obehandlade odlingar och olika lösningsmedel/vehiklar). Dessa positiva och negativa kontrollresponser bör överensstämma med litteraturen. Detta gäller inte laboratorier som redan har erfarenhet, dvs. har en historisk databas enligt punkterna 49–52.

Laboratoriet bör undersöka ett urval av positiva kontrollkemikalier (se tabell 1) med korta och långa behandlingar utan metabolisk aktivering, och även med kort behandlingstid med metabolisk aktivering, för att visa att det har kompetens att upptäcka klastogena och aneugena kemikalier, bestämma effektiviteten hos det metaboliska aktiveringssystemet och visa att klassificeringsförfarandena är lämpliga (visuell mikroskopianalys, flödescytometri, laserskanningcytometri eller bildanalys). En rad koncentrationer av de valda kemikalierna bör användas för att ge reproducerbara och koncentrationsrelaterade ökningar över bakgrunden i syfte att visa testsystemets sensitivitet och dynamiska omfång.

Historiska kontrolldata

Laboratoriet bör fastställa följande:

- Historiskt positivt kontrollintervall samt fördelning.
- Historiskt negativt (obehandlad, lösningsmedel) kontrollintervall samt fördelning.

Om data för en historisk negativ kontrollfördelning samlas in först bör de parallella negativa kontrollerna överensstämma med publicerade data för negativa kontroller om sådana finns. Allteftersom kontrollfördelningen kompletteras med fler försöksdata bör de parallella negativa kontrollerna i idealfallet ligga inom fördelningens kontrollgräns på 95 % (87) (88). Laboratoriets historiska negativa kontrolldatabas kontroll bör inledningsvis baseras på minst 10 försök, men bör helst bestå av minst 20 försök utförda under jämförbara försöksbetingelser. Laboratorierna bör använda kvalitetskontrollmetoder såsom kontrolldiagram (t.ex. C-diagram eller X-stapelldiagram (88)), för att fastställa hur variabla deras positiva och negativa kontrolldata är och för att visa att metoden är "under kontroll" (83). Fler rekommendationer om hur man bygger upp och använder historiska kontrolldatabaser (t.ex. kriterier för att innefatta och utesluta data samt acceptanskriterier för ett givet försök) finns i litteraturen (87).

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

Negativa kontrolldata bör bestå av förekomsten av celler med mikrokärnor från en enda odling eller summan av replikatodlingar enligt beskrivningen i punkt 28. Parallella negativa kontroller bör helst ligga inom kontrollgränsen på 95 % för fördelningen av laboratoriets historiska negativa kontrolldatabas (87) (88). Om parallella negativa kontrolldata faller utanför kontrollgränserna på 95 % kan de ändå ingå i den historiska kontrollfördelningen så länge de inte är extremt avvikande och det finns bevis för att testsystemet är under kontroll (se punkt 50) och att inga tekniska eller mänskliga fel begåtts.

DATA OCH RAPPORTERING

Presentation av resultaten

Om blockering av cytokines används ska endast förekomsten av binukleära celler med mikrokärnor (oavsett antalet mikrokärnor per cell) användas för utvärderingen av inducering av mikrokärnor. Analysen av antalet celler med en, två eller flera mikrokärnor kan rapporteras separat och kan ge användbar information, men är inte obligatorisk.

Parallella mått på cytotoxicitet och/eller cytostas för alla behandlade odlingar och negativa och positiva kontrollodlingar bör bestämmas (16). Proliferationsindex vid cytokinesinhibering (CBPI) eller replikeringsindex (RI) bör beräknas för alla behandlade odlingar och kontrollodlingar som mått på cellcykelfördröjning när blockering av cytokines används. Om cytoB inte tillsätts bör relativ populationsfördubbling (RPD) eller relativ ökning av celltal (RICC) användas (se tillägg 2).

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

Kriterier för godkännande

Testet måste uppfylla följande kriterier för att godkännas:

- Den parallella negativa kontrollen måste anses godtagbar för registrering i laboratoriet historiska databas över negativa kontroller enligt punkt 50.
- Parallella positiva kontroller (se punkt 50) bör framkalla reaktioner som överensstämmer med de kontroller som genereras i laboratoriets historiska databas över positiva kontroller och ge en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.
- Cellproliferationskriterierna i lösningsmedelskontrollen bör vara uppfyllda (punkterna 25–27).
- Samtliga försöksbetingelser testades om inte ett gav positiva resultat (punkterna 36–40).
- Tillräckligt många celler och koncentrationer finns tillgängliga för analys (punkterna 28 och 44–46).
- Urvalskriterierna för toppkoncentrationen överensstämmer med de kriterier som beskrivs i punkterna 24–

Utvärdering och tolkning av resultaten

Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart positiv om något av följande gäller för någon av de undersökta försöksbetingelserna (se punkterna 36–39):

- Åtminstone en av testkoncentrationerna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen (89).
- Ökningen är dosrelaterad i åtminstone en försöksbetingelse vid utvärdering med ett lämpligt trendtest (se punkt 28).
- Något av resultaten ligger utanför fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser, se punkt 52).

Om alla dessa kriterier är uppfyllda anses testkemikalien kunna inducera kromosombrott och/eller vinst eller förlust hos odlade däggdjursceller i detta testsystem. Rekommendationer om de lämpligaste statistiska metoderna finns även i litteraturen (90) (91) (92).

Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart negativ om följande gäller för samtliga undersökta försöksbetingelser (se punkterna 36–39):

- Ingen av testkoncentrationerna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.
- Det finns ingen koncentrationsrelaterad ökning vid utvärdering med ett lämpligt trendtest.
- Alla resultat ligger inom fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser, se punkt 52).

Testkemikalien anses inte kunna inducera kromosombrott och/eller vinst eller förlust hos odlade däggdjursceller i detta testsystem. Rekommendationer om de lämpligaste statistiska metoderna finns även i litteraturen (90) (91) (92).

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

Om responsen varken är klart negativ eller klart positiv enligt beskrivningen ovan och/eller för att göra det lättare att fastställa resultatets biologiska relevans bör uppgifterna fackgranskas och/eller undersökas ytterligare. Det kan även vara användbart att klassificera ytterligare celler (i förekommande fall) eller upprepa försöket, eventuellt med ändrade försöksbetingelser (t.ex. koncentrationsavstånd, andra metaboliska aktiveringsbetingelser [dvs. S9 koncentration eller S9-ursprung]) kan vara användbart.

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

Att testkemikalier inducerar mikrokärnor i MNvit-testet kan bero på att de inducerar kromosombrott, kromosomförlust eller en kombination av dessa två. Ytterligare analys med användning av anti-kinetokor-antikroppar, centromerspecifika in situ-prober eller andra metoder kan göras för att avgöra huruvida mekanismen för inducering av mikrokärnor beror på klastogen och/eller aneugen aktivitet.

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

- Källa, satsnummer, sista förbrukningsdag om detta anges.
- Testkemikaliens stabilitet i sig, om den är känd.
- Testkemikaliernas reaktionsbenägenhet med lösningsmedel/vehikel eller cellodlingsmedier.
- Löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet, om detta är känt.
- Mätning av pH, osmolalitet och utfällningar i det odlingsmedium till vilket testkemikalien tillsattes, i förekommande fall.

Monokomponentämne:

- fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,
- kemiska beteckningar, såsom IUPAC- eller CAS-beteckning, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturell formel, renhet, kemisk beteckning på föreningar i förekommande fall och om möjligt osv.

Multikomponentämne, UVCB och blandningar:

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

Lösningsmedel:

- Motivering av valet av lösningsmedel.
- Procentandelen lösningsmedel i den slutliga odlingsmediet.

Celler:

- Cellernas typ och källa.
- Den använda celltypens lämplighet.
- Avsaknad av mykoplasma för cellinjer.
- Uppgifter om cellcykelns längd eller proliferationsindex.
- Om lymfocyter används, blodgivarnas kön, ålder och annan relevant information om givarna, helblod eller separerade lymfocyter, använd mitogen substans.
- Normal cellcykellängd (negativ kontroll).
- Antal passager för cellinjer om sådan information finns.
- Metoder för underhållet av cellodlingar för cellinjer.
- Det modala antalet kromosomer för cellinjer.

Testbetingelser:

- Identitet för cytokinesinhiberande ämne (t.ex. cytoB), om sådant används, och ämnets koncentration samt cellexponeringens varaktighet
- Testkemikalies koncentration, uttryckt som slutlig koncentration i odlingsmediet (t.ex. µg eller mg/mL eller mM av odlingsmediet).
- Grund för val av koncentrationer och antalet kulturer inklusive data för cytotoxicitet och löslighetsbegränsningar.
- Mediets sammansättning, CO₂-koncentration, om detta är tillämpligt, fuktighetsnivå.
- Koncentration (och/eller volym) av det lösningsmedel och den testkemikalie som tillsätts odlingsmediet.
- Inkubationstemperatur och tid.
- Behandlingens varaktighet.
- Tidpunkten för skörd efter behandlingen.
- Celldensitet vid inokulering, om tillämpligt.
- Typ och sammansättning hos det system som används för metabolisk aktivering (S9-källa, beredningsmetod för S9-blandningen, koncentration eller volym för S9-blandningen, S9 i det slutliga odlingsmediet, kvalitetskontroller av S9, t.ex. enzymatisk aktivitet, sterilitet, metabolisk kapacitet).
- Positiva och negativa kontrollkemikalier, slutkoncentrationer, behandlingsbetingelser och behandlingslängder samt återhämtningsperioder.
- Metoder för preparering av utstryksglas och färgningsteknik.
- Kriterier för klassificering av mikrokärnor i celler (urval av analyserbara celler samt identifiering av mikrokärnor).
- Antalet analyserade celler.

- Metoder för mätning av cytotoxicitet.
- All tilläggsinformation som är relevant rörande cytotoxicitet samt använd metod.
- Kriterier för att bedöma om testresultaten är positiva, negativa eller tvetydiga.
- Metod(er) för statistisk analys.
- Metoder, såsom användning av anti-kinetokor-antikroppar eller pancentromerspecifika prober, för att fastställa om mikrokärnorna innehåller hela eller fragmenterade kromosomer, om tillämpligt.
- Använda metoder för att bestämma pH, osmolalitet och utfällningar.

Resultat:

- Definition av godkända celler för analys.
- Utan cytoB, antal behandlade celler och antal skördade celler för varje odling om cellinjer används.
- Mätning av använd cytotoxicitet, t.ex. CBPI eller RI när det gäller metoden för blockering av cytokines, RICC eller RPD när metoden för blockering av cytokines inte används, eventuella andra observationer (t.ex. cellkonfluens, apoptos, nekros, antal metafaser, frekvens för binukleära celler).
- Tecken på utfällning och tid för bestämningen.
- Data om behandlingsmediets pH och osmolalitet, om uppmätt.
- Fördelningen av mono-, bi- och multinukleära celler i fall där blockering av cytokines har använts.
- Antalet celler med mikrokärnor angivet separat för varje behandlad odling och kontrollodling och, där det är lämpligt, angivelse av huruvida det gäller binukleära eller mononukleära celler.
- Koncentration-responsförhållande, där det är möjligt.
- Data om parallella negativa (lösningsmedel) och positiva kontroller (koncentrationer och lösningsmedel).
- Historiska negativa (lösningsmedel) och positiva kontrolldata med intervall, medelvärden, standardavvikelser och 95 %-kontrollgränser för distribution samt antalet uppgifter.
- Statistisk analys, p-värden om sådana finns.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

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, s. 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, s. 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. m.fl. (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 35/3, s. 167–172.
- (6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, vol. 2/5, s. 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, s. 193–198.
- (8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 13/1, s. 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, s. 9–20.
- (10) Miller, B.M. m.fl. (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, s. 297–302.
- (11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis*, vol. 8/4, s. 329–334.
- (12) Migliore, L. m.fl. (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, s. 205–213.
- (13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis*, vol. 8/6, s. 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, s. 9–20.
- (15) Marshall, R.R. m.fl. (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research*, vol. 372/2, s. 233–245.
- (16) Zijno, P. m.fl. (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 m.fl. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research*, vol. 540/2, s. 153–163.
- (18) Kapitel B.10 i denna bilaga: Test *in vitro* av kromosomavvikelser hos däggdjur.
- (19) Lorge, E. m.fl. (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research*, vol. 607/1, s. 13–36.
- (20) Clare, G. m.fl. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research*, vol. 607/1, s. 37–60.
- (21) Aardema, M.J. m.fl. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research*, vol. 607/1, s. 61–87.
- (22) Wakata, A. m.fl. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research*, vol. 607/1, s. 88–124.

- (23) Oliver, J. m.fl. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research*, vol. 607/1, s. 125–152.
- (24) Albertini, S. m.fl. (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research*, vol. 392/1-2, s. 187–208.
- (25) Miller, B. m.fl. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research*, vol. 392/1-2, s. 45–59.
- (26) Miller, B. m.fl. (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, s. 81–116.
- (27) Kalweit, S. m.fl. (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches. *Mutation Research*, vol. 439/2, s. 183–190.
- (28) Kersten, B. m.fl. (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research*, vol. 445/1, s. 55–71.
- (29) von der Hude, W. m.fl. (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, s. 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, s. 123–134.
- (31) Matsushima, T. m.fl. (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis*, vol. 14/6, s. 569–580.
- (32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research*, vol. 607/1, s. 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, s. 139–147.
- (34) Hashimoto K. m.fl. (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, s. 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, s. 373–384.
- (36) Zhang, L.S. m.fl. (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, s. 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:e möte den 16–17 november 2006. Finns 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. Finns på <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (39) Corvi, R. m.fl. (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. m.fl. (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, s. 147–205.
- (42) Morita, T. m.fl. (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research*, vol. 268/2, s. 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, s. 789–886.
- (44) Lång, L.H. m.fl. (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, s. 177–183.
- (45) Nesslany, F. m.fl. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation*, vol. 49, s. 439–452.
- (46) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, vol. 147/1-2, s. 29–36.
- (47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research*, vol. 392, s. 11–18.
- (48) Payne, C.M. m.fl. (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, s. 825–840.
- (49) Bazin, E. m.fl. (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin, Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 51/3, s. 251–259.
- (50) Le Hegarat, L. m.fl. (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, s. 555–560.
- (51) Josse, R. m.fl. (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, vol. 27/3, s. 295–304.
- (52) Ehrlich, V. m.fl. (2002). Fumonisin B₁ is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis*, vol. 17/3, s. 257–260.
- (53) Knasmüller, S. m.fl. (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, vol. 198/1-3, s. 315–328.
- (54) Gibson, D.P. m.fl. (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, s. 61–70.
- (55) Bonassi, S. m.fl. (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, s. 31–45.
- (56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, vol. 113/3-4, s. 173–215.
- (57) Ong, T.-m. m.fl. (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, s. 55–65.

- (58) Elliott, B.M. m.fl. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, vol. 7, s. 175–177.
- (59) Matsushima, T. m.fl. (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, s. 51–59.
- (61) Unep (2001). Stockholmskonventionen om långlivade organiska föreningar, FN:s miljöprogram (Unep). Finns 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, s. 225–228.
- (63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooley (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, s. 91–103.
- (64) Zamora, P.O. m.fl. (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, s. 795–801.
- (65) Asakura, M. m.fl. (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, vol. 652/2, s. 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, s. 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, s. 103–112.
- (68) Kirsch-Volders, M. m.fl. (2004). Corrigendum to "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group". *Mutation Research*, 564, 97–100.
- (69) Lorge, E. m.fl. (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, s. 1–3.
- (70) Surrallés, J. m.fl. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, vol. 341/3, s. 169–184.
- (71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, vol. 724, s. 86–87.
- (72) Pfuhler, S. m.fl. (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, vol. 723/2, s. 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 (testriktlinjer 473, 476 och 487). ENV/JM/TG(2014)17. Tillgänglig på begäran.
- (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, s. 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, s. 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. m.fl. (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research*, vol. 746/1, s. 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, s. 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, s. 269–275.
- (80) Bryce, S.M. m.fl. (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 52/4, s. 280–286.
- (81) Nicolette, J. m.fl. (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 52/5, s. 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, s. 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. m.fl. (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, s. 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, s. 193–198.
- (86) Kirsch-Volders, M. m.fl. (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, s. 873–899.
- (87) Hayashi, M. m.fl. (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 723/2, s. 87–90.
- (88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. andra utgåvan, John Wiley & 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, s. 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. m.fl. (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 10/suppl. 10, s. 1–175.
- (92) Richardson, C. m.fl. (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.
-

Tillägg 1

DEFINITIONER

Aneugen: en kemikalie eller en process som genom växelverkan med komponenterna i den mitotiska och meiotiska celldelningscykeln leder till aneuploidi i celler eller organismer.

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

Apoptos: programmerad celldöd som karakteriseras av en serie steg som leder till sönderfall av celler till membranbundna partiklar som därefter elimineras genom fagocytos eller avstötning.

Cellproliferation: ökning av antalet celler som resultat av mitotisk celldelning.

Centromer: den DNA-region på en kromosom där de båda kromatiderna hålls samman och på vilken de båda kinetokorerna är fästa på varsin sida.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Koncentrationer: slutliga koncentrationer av testkemikalien i odlingsmediet.

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

Cytokines: den celldelning som följer omedelbart efter mitosen vid vilken två dotterceller bildas med var sin enskild kärna.

Proliferationsindex vid cytokinesinhibering (CBPI): förhållandet mellan antalet celler efter två delningar i den behandlade populationen och motsvarande antal i den obehandlade kontrollen (se tillägg 2 för formel).

Cytostas: inhibering av celltillväxt (se tillägg 2 för formel).

Cytotoxicitet: för försök med användning av cellinjer som omfattas av denna testmetod som utförs med tillsats av cytochalin B avser cytotoxicitet en minskning av proliferationsindexet vid cytokinesinhibering (CBPI) eller replikeringsindexet (RI) i behandlade celler jämfört med den negativa kontrollen (se punkt 26 och tillägg 2).

För försök med användning av cellinjer som omfattas av denna testmetod som utförs i avsaknad av cytochalin B avser cytotoxicitet en minskning av den relativa populationsfördubblingen (RPD) eller en relativ ökning av celltal (RICC) i behandlade celler jämfört med den negativa kontrollen (se punkt 27 och tillägg 2).

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

Interfasceller: celler som inte är i mitotisk fas.

Kinetokor: en proteinstruktur som bildas vid centromeren på en kromosom och till vilken kärnspolefibrer binds under celldelning, vilket möjliggör en ordnad rörelse av dotterkromosomerna mot dottercellernas poler.

Mikrokärnor: Små extra kärnor som är separata från cellernas huvudkärna och som produceras under mitosens eller meiosens telofas från isolerade kromosomfragment eller hela kromosomer.

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

Mitotiskt index: den andel celler som är i metafase delat med det totala antalet celler som kan observeras i en cellpopulation; en indikation på graden av celltillväxt hos den populationen.

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

Icke-disjunktion: När kromatidpar inte separeras och segregeras korrekt till dottercellerna under utveckling, vilket leder till dotterceller med onormalt antal kromosomer.

p53-status: p53-proteinet är involverat i cellcykelreglering, apoptos och DNA-reparation. Celler som lider brist på funktionellt p53-protein och är oförmögna att stoppa cellcykeln eller eliminera skadade celler via apoptos eller andra mekanismer (t.ex. induktion av DNA-reparation) i samband med p53-funktioner till svar på en DNA-skada, bör teoretiskt sett vara mer benägna till genmutationer eller kromosomavvikelser.

Polyploidi: Numeriska kromosomavvikelser i celler eller organismer som inbegriper en eller flera hela kromosomuppsättningar, i motsats till en enskild kromosom eller kromosomer (aneuploidi).

Proliferationsindex (PI): Ett sätt att mäta cytotoxicitet när cytoB inte används (se tillägg 2 för formel).

Relativ ökning av celltal (RICC): Ett sätt att mäta cytotoxicitet när cytoB inte används (se tillägg 2 för formel).

Relativ populationsfördubbling (RPD): Ett sätt att mäta cytotoxicitet när cytoB inte används (se tillägg 2 för formel).

Replikeringsindex (RI): Andelen celldelningscykler som slutförts i en behandlad odling under exponeringsperioden och återhämtningen, i förhållande till den obehandlade kontrollen (se tillägg 2 för formel).

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

S9-blandning: blandning av S9-leverfraktion och kofaktorer som krävs för metaboliska enzyms aktivitet.

Lösningsmedelskontroll: Allmän term för att definiera kontrollodlingar där endast lösningsmedel används för att lösa upp testkemikalien.

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

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

Tillägg 2

FORMLER FÖR BESTÄMNING AV CYTOTOXICITET

När cytoB används ska bedömningen av cytotoxicitet basera sig på **proliferationsindex vid cytokinesinhibering (CBPI) eller replikeringsindex (RI)** (17) (69). CBPI anger det genomsnittliga antalet kärnor per cell och kan användas för att beräkna cellproliferationen. Replikeringsindex indikerar det relativa antalet cellcykler per cell under exponeringsperioden för cytoB i behandlade odlingar i jämförelse med kontrollodlingar och kan användas för att beräkna procentandelen cytostas:

$$\% \text{ cytostas} = 100 - 100 \{ (CBPI_T - 1) \div (CBPI_C - 1) \}$$

och

T = odling behandlad med testkemikalie

C = kontrollodling

där

$$CBPI = \frac{((\text{antal mononukleära celler}) + (2 \times \text{antal binukleära celler}) + (3 \times \text{antal multinukleära celler}))}{(\text{totalt antal celler})}$$

Således gäller att ett CBPI-värde på 1 (alla celler är mononukleära) motsvarar 100 % cytostas.

$$\text{Cytostas} = 100 - RI$$

$$RI = \frac{((\text{antal binukleära celler}) + (2 \times \text{antal multinukleära celler})) / (\text{totalt antal celler})_T}{((\text{antal binukleära celler}) + (2 \times \text{antal multinukleära celler})) / (\text{totalt antal celler})_C} \times 100$$

T = behandlade odlingar

C = kontrollodlingar

Således betyder ett RI-värde på 53 % att, jämfört med antalet celler som har delat sig till binukleära och multinukleära celler i kontrollodlingen, endast 53 % av detta antal har delat sig i den behandlade odlingen, dvs. 47 % cytostas.

När cytoB inte används, rekommenderas att cytotoxiciteten utvärderas på grundval av **relativ ökning av celltal (RICC)** eller **relativ populationsfördubbling (RPD)** (69), eftersom den andel av cellpopulationen som har delat sig beaktas i båda metoderna.

$$RICC(\%) = \frac{(\text{ökning av antalet celler i behandlade kulturer}(\text{slutligt-initialt}))}{(\text{ökning av antalet celler i kontrollkulturer}(\text{slutligt-initialt}))} \times 100$$

$$RPD(\%) = \frac{(\text{antal populationsfördubblingar i behandlade kulturer})}{(\text{antal populationsfördubblingar i behandlade kulturer})} \times 100$$

där

Populationsfördubbling: $[\log (\text{Cellantal efter behandling} \div \text{Ursprungligt cellantal})] \div \log 2$

Således indikerar ett RICC-värde eller ett RPD-värde på 53 % att det förekommer 47 % cytotoxicitet/cytostas.

Genom att använda ett **proliferationsindex (PI)** kan cytotoxiciteten bestämmas genom att räkna antalet kloner som består av 1 cell (cl1), 2 celler (cl2), 3 till 4 celler (cl4) och 5 till 8 celler (cl8).

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

PI har använts som en värdefull och tillförlitlig cytotoxicitetsparameter även för cellinjer som har odlats in vitro utan tillsats av cytoB (35) (36) (37) (38) och kan anses utgöra en användbar ytterligare parameter.

I alla händelser bör antalet celler före behandling vara detsamma för behandlade och negativa kontrollodlingar.

Tidigare användes RCC (dvs. antalet celler i behandlade kulturer/antalet celler i kontrollkulturer) som cytotoxicitetsparameter, men rekommenderas inte längre eftersom cytotoxiciteten kan underskattas enligt detta mått.

Vid användning av automatiska klassificeringssystem, t.ex. flödescytometri, laserskanningcytometri eller bildanalys, kan antalet celler i formeln ersättas med antalet kärnor.

I de negativa kontrollodlingarna bör populationsfördubbling eller replikatindex överensstämma med kravet att provta celler efter behandlingen vid en tidpunkt som motsvarar cirka 1,5–2,0 gånger den normala cellcykeln.”

(15) I del B ska följande kapitel läggas till:

”B.59 Hudsensibilisering in chemico: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)

INLEDNING

Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 442C (2015). Hudsensibiliserande ämnen är ämnen som leder till en allergisk reaktion efter hudkontakt enligt definitionen i FN:s globala harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (1) och förordning (EC) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP-förordningen) (¹). Denna testmetod utgörs av ett förfarande in chemico (Direct Peptide Reactivity Assay – DPRA) som används för att skilja mellan hudsensibiliserande ämnen och icke-hudsensibiliserande ämnen enligt FN:s GHS-klassificering och CLP-förordningen.

Det råder allmän enighet om de viktigaste biologiska händelserna som utlöser hudsensibilisering. Den befintliga kunskapen om de kemiska och biologiska mekanismer som är förknippade med hudsensibilisering har sammanfattats i form av AOP (Adverse Outcome Pathway) (2), från den inledande molekylära händelsen via de mellanliggande händelser som orsakar den negativa effekten, nämligen allergisk kontaktdermatit hos människor och överkänslighet mot kontakt hos gnagare. Inom AOP för hudsensibilisering är den molekylära inledande händelsen en kovalent bindning av elektrofila ämnen till nukleofila centrum i hudproteiner.

Bedömning av hudsensibiliteten har normalt inneburit användning av försöksdjur. I de klassiska metoderna som baseras på marsvin, Magnusson Kligman Guinea Pig Maximisation Test (GPMT) och Buehler-testet (TM B.6 (3)), undersöks både induktions- och eliciteringsfaserna i hudsensibilisering. Ett murintest, Local Lymph Node Assay (LLNA, TM B.42 (4)) och dess två icke radioaktiva modifieringar, LLNA: DA (TM B.50 (5)) och LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (6)), som endast bedömer induktionsresponsen, har också vunnit erkännande eftersom de är mer fördelaktiga än marsvinstester ur djurskyddssynpunkt och ger en objektiv mätning av induktionsfasen i hudsensibilisering.

Mer nyligen har man kommit fram till att mekaniskt baserade tester in chemico och in vitro kan anses vara vetenskapligt giltiga för utvärdering av kemikaliers hudsensibiliserande faror. Det är dock nödvändigt att kombinera metoder utan försöksdjur (in silico, in chemico, in vitro) inom IATA (Integrated Approaches to Testing and Assessment) för att fullständigt ersätta de djurförsök som används i dagsläget, med tanke på AOP:s begränsade mekanistiska täckning av de testmetoder utan försöksdjur som finns tillgängliga för närvarande (2) (7).

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

Tanken med DPRA-metoden är att den ska ersätta den molekylära inledande händelsen vid hudsensibiliserande AOP, nämligen proteinreaktiviteten, genom att kvantifiera testkemikaliernas reaktivitet mot modellens syntetiska peptider, som innehåller antingen lysin eller cystein (8). Procentvärdena för minskning av cystein- och lysinpeptidnivåer används sedan för att kategorisera ämnet i en av fyra reaktivitetsklasser i syfte att skilja mellan hudsensibiliserande och icke-hudsensibiliserande ämnen (9).

DPRA har utvärderats i en valideringsstudie som leddes av EU:s referenslaboratorium inom Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (EURL ECVAM) samt i efterföljande oberoende granskningar av EURL ECVAM:s rådgivande vetenskapliga kommitté (ESAC), och ansågs vetenskapligt giltig (10) för användning som en del av en IATA i syfte att skilja mellan hudsensibiliserande och icke-hudsensibiliserande ämnen vid faroklassificering och märkning. Exempel på användningen av DPRA-data i kombination med annan information finns i litteraturen (11) (12) (13) (14).

Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN, TILLÄMPLIGHET OCH BEGRÄNSNINGAR

Sambandet mellan proteinreaktivitet och risk för hudsensibilisering är väletablerat (15) (16) (17). Proteinbindning är endast en av de viktiga händelserna i processen. Trots den molekylära inledande händelsen i AOP-hudsensibilisering kan det hända att den information om proteinreaktivitet som genereras med metoder med och utan testning inte är tillräcklig i sig för att dra slutsatser om kemikaliers hudsensibiliserande potential. De data som genereras med denna testmetod bör därför övervägas inom ramen för integrerade strategier som IATA och kombineras med annan kompletterande information, t.ex. från in vitro-test rörande andra nyckelhändelser i AOP-hudsensibiliseringen samt metoder utan testning, inklusive jämförelser från kemiskt analoga ämnen.

Denna testmetod kan, i kombination med annan kompletterande information, användas för att skilja mellan hudsensibiliserande kemikalier (dvs. GHS-/CLP-kategori 1) och icke-hudsensibiliserande ämnen inom ramen för IATA. Testmetoden kan inte användas fristående, vare sig för att dela in hudsensibiliserande ämnen i underkategorierna 1A och 1B enligt GHS/CLP, eller för att förutsäga styrka när det gäller säkerhetsbedömningsbeslut. Beroende på tillämpligt regelverk kan dock ett positivt resultat med DPRA användas fristående för att klassificera kemikalier i GHS-/CLP-kategori 1.

DPRA-testmetoden har visat sig vara överförbar till laboratorier som har erfarenhet av analyser med vätskekromatografi (HPLC). Testmetodens förväntade reproducerbarhet är i storleksordningen 85 % inom laboratorier och 80 % mellan laboratorier (10). De resultat som genereras i valideringsstudien (18) och publicerade undersökningar (19) visar generellt att noggrannheten hos DPRA när det gäller att skilja mellan hudsensibiliserande ämnen (dvs. GHS-/CLP-kategori 1) och icke-hudsensibiliserande kemikalier är 80 % (N = 157) med en känslighet på 80 % (88/109) och en specificitet på 77 % (37/48) vid en jämförelse med LLNA-resultat. Det är mer sannolikt att DPRA underskattar kemikalier som visar en låg till måttlig hudsensibiliserande styrka (dvs. GHS-/CLP-underkategori 1B) än kemikalier som visar en hög hudsensibiliserande styrka (dvs. GHS/CLP-underkategori 1A) (18) (19). De noggrannhetsvärden som anges här för DPRA som en fristående testmetod är dock endast vägledande, eftersom testmetoden bör övervägas i kombination med andra informationskällor inom ramen för en IATA och enligt beskrivningen i punkt 9. Vid utvärderingen av testmetoder med avseende på hudsensibilisering utan djurförsök bör man dessutom tänka på att både LLNA-testet och andra djurförsök kanske inte fullständigt avspeglar situationen för de arter som är av intresse, t.ex. människor. Tillgängliga uppgifter visar att DPRA är tillämplig på testkemikalier som täcker en rad olika organiska funktionella grupper, reaktionsmekanismer, hudsensibiliseringsstyrkor (detta har fastställts i in vivo-undersökningar) och fysikalisk-kemiska egenskaper (8) (9) (10) (19). Sammantaget visar informationen att DPRA bidrar till att identifiera risker för hudsensibilisering.

I denna metod avser begreppet "testkemikalie" endast testade kemikalier. Frågan om huruvida DPRA är tillämplig på testning av ämnen och/eller blandningar tas inte upp här. Denna testmetod är inte tillämplig på testning av metallföreningar, eftersom de är kända att reagera på proteiner med andra mekanismer än kovalent bindning. Testkemikalien bör vara lös i ett lämpligt lösningsmedel vid en slutlig koncentration på 100 mM (se punkt 18). Testkemikalier som inte är lösliga vid denna koncentration kan dock testas vid lägre lösliga koncentrationer. I ett sådant fall kan ett positivt resultat fortfarande användas som underlag för att identifiera testkemikalien som hudsensibiliserande. Definitiva slutsatser om avsaknad av reaktivitet bör dock inte dras från negativa resultat. För närvarande finns endast begränsad information om DPRA:s tillämplighet på blandningar med känd sammansättning (18) (19). DPRA anses dock vara tekniskt tillämplig på testning av multikomponentämnen och blandningar med känd sammansättning (se punkt 18). Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag. Beroende på testkemikaliens och peptidens definierade molförhållande kan den nuvarande prediktionsmodellen inte användas för komplexa blandningar med okänd sammansättning eller ämnen med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiska material (dvs. UVCB-ämnen). För detta ändamål är det nödvändigt att utveckla en ny prediktionsmodell baserad på en gravimetrisk strategi. Om det finns bevis för att testmetoden inte är tillämplig på andra specifika kemikaliekategorier bör den inte användas för dessa kategorier.

Testmetoden är en *in chemico*-metod som inte omfattar ett metaboliskt system. Kemikalier som kräver enzymatisk bioaktivering för att deras hudsensibiliserande potential ska aktiveras (t.ex. prohaptener) kan inte detekteras med denna testmetod. Kemikalier som blir hudsensibiliserande efter abiotisk transformation (dvs. prehaptener) rapporteras i vissa fall detekteras korrekt av testmetoden (18). Mot bakgrund av ovanstående bör negativa resultat som erhålls med testmetoden tolkas inom ramen för de fastställda begränsningarna och tillsammans med andra informationskällor inom ramen för en IATA. Testkemikalier som saknar en kovalent bindning till peptiden, men som får peptiden att oxidera (t.ex. cystein-dimerisering) kan leda till en eventuell överskattning av peptidens minskning, vilket i sin tur eventuellt kan leda till falska positiva förutsägelser och/eller till att kemikalien anvisas en högre reaktivitetsklass (se punkterna 29 och 30).

Såsom beskrivits bidrar DPRA till att skilja mellan hudsensibiliserande och icke-hudsensibiliserande kemikalier. Metoden kan eventuellt även bidra till bedömningen av sensibiliseringspotential (11) vid användning av integrerade strategier såsom IATA. Det krävs dock ytterligare arbete, företrädesvis baserat på data om människor, för att avgöra om DPRA-resultat eventuellt kan ligga till grund för bedömningar av sensibiliseringspotential.

TESTPRINCIP

DPRA är en *in chemico*-metod som kvantifierar den kvarstående koncentrationen av peptider som innehåller cystein eller lysin efter en 24-timmars inkubationsperiod med testkemikalien vid $25 \pm 2,5$ °C. De syntetiska peptiderna innehåller fenylalanin för att underlätta detektering. Den relativa peptidkoncentrationen mäts med vätskekromatografi (HPLC), med gradienteluering och UV-detektion vid 220 nm. Därefter beräknas procentvärdena för minskning av cystein- och lysinpeptidnivåer och används i en prediktionsmodell (se punkt 29), som gör det möjligt att kategorisera ämnet i en av fyra reaktivitetsklasser, som används för att skilja mellan hudsensibiliserande och icke-hudsensibiliserande ämnen (9).

För att visa att det finns tillräcklig erfarenhet av testet innan det används för rutintestning bör laboratoriet visa teknisk kompetens med hjälp av de tio kvalifikationsämnen som anges i tillägg 2.

FÖRFARANDE

Denna testmetod är baserad på DPRA DB-ALM-protokoll nr 154 (20), som är det protokoll som använts för EURL ECVAM:s samordnade valideringsstudie. Detta protokoll bör tillämpas när metoden genomförs och används i laboratoriet. Nedan följer en beskrivning av de huvudsakliga delarna i och förfarandena för DPRA. Om en alternativ HPLC-konfiguration används bör laboratoriet visa att den motsvarar den validerade konfiguration som beskrivs i DB-ALM-protokollet (t.ex. genom att testa kvalifikationsämnena i tillägg 2).

Beredning av cystein- eller lysinpeptider

Nya stamlösningar av cystein (Ac-RFAACAA-COOH) och lysin (Ac-RFAAKAA-COOH) innehållande syntetiska peptider med en renhetsgrad på över 85 % och helst inom intervallet 90–95 %, bör beredas strax innan inkubationen med testkemikalien. Den slutliga koncentrationen av cysteinpeptider bör vara 0,667 mM i pH 7,5 fosfatbuffert och den slutliga koncentrationen av lysinpeptider bör vara 0,667 mM i pH 10,2 ammoniumacetatbuffert. HPLC-körningssekvensen bör ställas in så att HPLC-analystiden är mindre än 30 timmar. När det gäller den HPLC-konfiguration som används i valideringsstudien och som beskrivs i denna testmetod kan man samla upp till 26 analysprover (inbegripet testkemikalien, den positiva kontrollen och ett lämpligt antal lösningskontroller baserat på det antal enskilda lösningsmedel som används i testet, vart och ett testat tre gånger) i en enda HPLC-körning. Identiska stamlösningar av cystein- och lysinpeptider bör användas i alla replikat som analyseras i samma körning. Enskilda peptidsatser bör provas för att kontrollera att lösligheten är lämplig före användning.

Beredning av testkemikalien

Testkemikaliens löslighet i ett lämpligt lösningsmedel bör bedömas innan försöket utförs. Bedömningen bör göras enligt det upplösningsförfarande som beskrivs i DPRA DB-ALM-protokollet (20). Testkemikalien löses upp fullständigt med ett lämpligt lösningsmedel. Eftersom testkemikalien i DPRA-testet inkuberas i ett stort överskott av antingen cystein- eller lysinpeptider anses en visuell kontroll av bildningen av en klar lösning vara tillräcklig för att fastställa att testkemikalien (och alla dess komponenter vid testning av ett multikomponentämne eller en blandning) har lösts upp. Lämpliga lösningsmedel är acetonitril, vatten, 1:1 blandning vatten och acetonitril, isopropanol, aceton eller 1:1 blandning aceton och acetonitril. Andra lösningsmedel kan användas om de inte inverkar på peptidens stabilitet, vilket övervakas med referenskontroller (dvs. prover av enbart peptiden löses upp i det berörda lösningsmedlet, se tillägg 3). Om testkemikalien inte är löslig i några av dessa lösningsmedel bör man som ett sista alternativ försöka att lösa upp den i 300 µL DMSO och späda ut den lösningen med 2 700 µL acetonitril. Om testkemikalien inte är löslig i den blandningen heller bör man försöka lösa upp samma mängd av testkemikalien i 1 500 µL DMSO och späda ut den lösningen med 1 500 µL acetonitril. Testkemikalien bör vägas i förväg i glasflaskor och lösas upp omedelbart före testning i ett lämpligt lösningsmedel för att bereda en lösning på 100 mM. För blandningar och multikomponentämnen med känd sammansättning bör man fastställa en enda renhetsgrad genom summan av andelen av dess beståndsdelar (förutom vatten) samt en enda uppskattad molekylärvikt med hänsyn till individuell molekylärvikt för varje komponent i blandningen (förutom vatten) och deras individuella andelar. Den resulterande renhetsgraden och uppskattade molekylärvikten bör sedan användas för att beräkna den vikt av testkemikalien som krävs för att bereda en lösning på 100 mM. När det gäller polymerer för vilka det inte går att fastställa en dominerande molekylärvikt bör monomerens molekylärvikt (eller den uppskattade molekylärvikten för de olika monomerer som utgör polymeren) övervägas för beredningen av lösningen på 100 mM. Vid testning av blandningar, multikomponentämnen eller polymerer med känd sammansättning bör man även överväga att testa den rena kemikalien. För flytande kemikalier bör den rena kemikalien testas som den är: utan föregående utspädning genom inkubation med cystein- respektive lysinpeptiderna vid molförhållandena 1:10 och 1:50. För fasta kemikalier bör testkemikalien lösas upp i sin högsta lösningsbara koncentration i samma lösningsmedel som använts för att bereda 100 mM-lösningen. Den bör sedan testas som den är: utan ytterligare utspädning genom inkubation med cystein- respektive lysinpeptiderna vid förhållandena 1:10 och 1:50. Överensstämmande resultat (reaktiva och icke-reaktiva) mellan 100 mM-lösningen och den rena kemikalien bör möjliggöra en definitiv slutsats om resultatet.

Beredning av den positiva kontrollen, referenskontrollerna och kontrollerna av sameluering

Kanelaldehyd (CAS 104-55-2, ≥ 95 % livsmedelskvalitet) bör användas som positiv kontroll vid en koncentration på 100 mM i acetonitril. Andra lämpliga positiva kontroller som företrädesvis ger minskningsvärden i mitten av intervallet kan användas om historiska data finns tillgängliga för att härleda jämförbara acceptanskriterier. Dessutom bör även referenskontroller (dvs. prover som endast innehåller peptiden upplöst i lämpligt lösningsmedel) ingå i HPLC-körningssekvensen. Referenskontroller används för att kontrollera HPLC-systemets lämplighet före analysen (referenskontroller A), referenskontrollernas stabilitet över tiden (referenskontroller B) samt för att kontrollera att det lösningsmedel som används för att lösa upp testkemikalien inte påverkar procentvärdet för peptidens minskning (referenskontroller C) (se tillägg 3). Lämpliga referenskontroller för varje kemikalie används för att beräkna procentvärdet för peptidens minskning för den kemikalien (se punkt 26). Dessutom bör en samelueringsskontroll bestående av endast testkemikalien för varje analyserad testkemikalie ingå i körningssekvensen för att upptäcka eventuell sameluering av testkemikalien med antingen lysin- eller cysteinpeptiden.

Inkubation av testkemikalien med cystein- och lysinpeptidlösningar

Cystein- och lysinpeptidlösningarna bör inkuberas i autosampler-glasflaskor med testkemikalien vid ett förhållande på 1:10 respektive 1:50. Om en fällning omedelbart observeras när lösningen med testkemikalien tillsätts peptidlösningen på grund av att testkemikalien har en låg upplösning i vatten, kan man inte vara säker på hur stor mängd av testkemikalien som finns kvar i lösningen för att reagera med peptiden. I ett sådant fall kan ett positivt resultat fortfarande användas, men ett negativt resultat är osäkert och bör tolkas med vederbörlig försiktighet (se även anvisningarna i punkt 11 om testning av kemikalier som inte är lösliga upp till en lösning på 100 mM). Reaktionslösningen bör förvaras i mörker vid $25 \pm 2,5$ °C i 24 ± 2 timmar innan HPLC-analysen körs. Varje testkemikalie bör analyseras tre gånger för båda peptiderna. Proverna ska kontrolleras visuellt före HPLC-analysen. Om en fällning eller en fassparation observeras kan proverna centrifugeras vid låg hastighet ($100\text{--}400 \times g$) så att utfällningen förpassas till botten av flaskan som en försiktighetsåtgärd, eftersom stora mängder utfällningar kan fastna i HPLC-tuberna eller i kolonnerna. Om en fällning eller en fassparation observeras efter inkubationsperioden kan peptidernas minskning underskattas, vilket gör att man inte kan dra en tillräckligt tillförlitlig slutsats om avsaknad av reaktivitet i händelse av ett negativt resultat.

Beredning av standardkalibreringskurvan för HPLC

En standardkalibreringskurva bör genereras för både cystein- och lysinpeptiderna. Peptidstandarderna bör beredas i en lösning av 20 % eller 25 % acetonitrilbuffert med användning av fosfatbuffert (pH 7,5) för cysteinpeptiden och ammoniumacetatbuffert (pH 10,2) för lysinpeptiden. Om serieutspädningsstandarder används för peptidstamlösningen (0,667 mM) bör sex kalibreringslösningar beredas för att täcka intervallet från 0,534 till 0,0167 mM. Ett blankprov av utspädningsbufferten bör också ingå i standardkalibreringskurvan. Kalibreringskurvorna bör ha en $r^2 > 0,99$.

Förberedelse av HPLC och HPLC-analys

HPLC-systemets lämplighet bör kontrolleras innan analysen utförs. Peptidernas minskning övervakas av HPLC kombinerat med en UV-detektor (detektor med fotodiodkretsar eller en detektor med våglängdsabsorption med en signal på 220 nm). En lämplig kolonn installeras i HPLC-systemet. Den HPLC-konfiguration som beskrivs i det validerade protokollet använder en Zorbax SB-C-18 $2,1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm} \times 3,5$ mikron som föredragen kolonn. Med denna HPLC-kolonn med omvänd fas bör hela systemet bringas i jämvikt vid 30 °C med 50 % fas A (0,1 % (v/v)

trifluorättiksyra i vatten) och 50 % fas B (0,085 % (v/v) trifluorättiksyra i acetonitril) i minst två timmar före körning. HPLC-analysen bör utföras med hjälp av en flödes hastighet på 0,35 ml/min och en linjär gradient från 10 % till 25 % acetonitril under 10 minuter, följt av en snabb ökning till 90 % acetonitril för att avlägsna andra material. Lika stora volymer av varje standard, prov och kontroll bör injiceras. Kolonnen bör omkalibreras under initiala förhållanden i sju minuter mellan injektionerna. Om en annan HPLC-kolonn med omvänd fas används kan de konfigurationsparametrar som beskrivs ovan behöva justeras för att garantera lämplig eluering och integration av cystein- och lysinpeptiderna, inklusive injektionsvolymen, som kan variera beroende på använt system (vanligen i intervallet 3–10 µl). Om en alternativ HPLC-konfiguration används är det viktigt att laboratoriet visar att den motsvarar den validerade konfiguration som beskrivs ovan (t.ex. genom att testa kvalifikationsämnen i tillägg 2). Absorbansen övervakas vid 220 nm. Om en detektor med fotodiodkretsar används ska absorbans vid 258 nm också registreras. Det bör noteras att vissa acetonitrilpartier kan ha en negativ inverkan på peptidernas stabilitet. Detta måste bedömas när en ny acetonitrilsats används. Förhållandet mellan topparean vid 220 och topparean vid 258 kan användas som en indikator på sameluering. För varje prov ger ett förhållande i intervallet 90 % < medelvärdet ⁽¹⁾ för kontrollprovernas topparea < 100 % en god indikation på att sameluering inte har förekommit.

Vissa testkemikalier kan få cysteinpeptiden att oxidera. Toppen på den dimeriserade cysteinpeptiden kan övervakas visuellt. Om dimerisering tros ha förekommit bör detta registreras eftersom procentvärdet för peptidens minskning kan överskattas, vilket leder till falska positiva förutsägelser och/eller till att kemikalien anvisas en högre reaktivitetsklass (se punkterna 29 och 30).

HPLC-analysen av cystein- och lysinpeptiderna kan utföras parallellt (om två HPLC-system finns tillgängliga) eller olika dagar. Om analysen utförs olika dagar ska nya testkemikalielösningar beredas för båda försöken varje dag. Analysen bör planeras för att säkerställa att injiceringen av det första provet startar 22 till 26 timmar efter det att testkemikalien blandades med peptidlösningen. HPLC-körningssekvensen bör ställas in så att HPLC-analystiden är mindre än 30 timmar. När det gäller den HPLC-konfiguration som används i valideringsstudien och som beskrivs i denna testmetod kan man samla upp till 26 analysprover i en enda HPLC-körning (se även punkt 17). Ett exempel på en HPLC-analyssekvens ges i tillägg 3.

DATA OCH RAPPORTERING

Utvärdering av data

Koncentrationen av cystein- eller lysinpeptiderna fastställs fotometriskt vid 220 nm i varje prov genom mätning av topparean (Area Under the Curve, AUC) för lämpliga toppar och genom beräkning av peptidkoncentrationen med användning av den linjära kalibreringskurva som härrörts från standarderna.

Procentvärdet för peptidens minskning fastställs i varje prov genom att topparean mäts och divideras med medelvärdet för topparean för relevanta referenskontroller (se tillägg 3) enligt den formel som beskrivs nedan.

$$\text{Procent peptidminskning} = \left[1 - \left(\frac{\text{peptidens topparea i replikatinjektion}}{\text{peptidens genomsnittliga topparea i referenskontroller C}} \right) \right] \times 100$$

Kriterier för godkännande

Följande kriterier bör uppfyllas för att en körning ska anses vara giltig:

- Standardkalibreringskurvan ska ha en $r^2 > 0,99$.

⁽¹⁾ Medelvärde avser aritmetiskt medelvärde genomgående i dokumentet.

- b) Procentmedelvärdet för peptidernas minskning för de tre replikaten i den positiva kontrollen med kanelaldehyd bör vara mellan 60,8 % och 100 % för cysteinpeptider och mellan 40,2 % och 69,0 % för lysinpeptider. Högsta standardavvikelse (SD) för det positiva kontrollrepliketet bör vara < 14,9 % för procentvärdet för minskning av cystein och < 11,6 % för procentvärdet för minskning av lysin.
- c) Medelvärdet för peptidkoncentrationen i referenskontrollerna A bör vara $0,50 \pm 0,05$ mM och koefficientvariationen (CV) för peptidernas toppareor för de nio referenskontrollerna B och C i acetonitril bör vara < 15,0 %.

Om ett eller flera av dessa kriterier inte är uppfyllt bör körningen göras om.

Följande kriterier bör uppfyllas för att testresultatet för testkemikalien ska anses vara giltigt:

- a) Högsta standardavvikelse för testkemikalierreplikaten bör vara < 14,9 % för procentvärdet för minskning av cystein och < 11,6 % för procentvärdet för minskning av lysin.
- b) Peptidkoncentrationens medelvärde för de tre referenskontrollerna C i lämpligt lösningsmedel bör vara $0,50 \pm 0,05$ mM. Om dessa kriterier inte är uppfyllda bör data förkastas och körningen bör göras om för den specifika testkemikalien.

Prediktionsmodell

Procentmedelvärdet för minskning av cystein och lysin beräknas för varje testkemikalie. Negativ minskning anses vara "0" när medelvärdet beräknas. Genom att använda den prediktionsmodell med cystein 1:10/lysin 1:50 som visas i tabell 1 bör gränsvärdet 6,38 % för genomsnittlig minskning av peptiden användas för att skilja mellan hudsensibiliserande och icke-hudsensibiliserande kemikalier inom ramen för en IATA. Prediktionsmodellen kan användas för att tilldela testkemikalien en reaktivitetsklass (dvs. låg, måttlig och hög reaktivitet) som underlag för bedömningen av sensibiliseringspotential inom ramen för en IATA.

Tabell 1

Prediktionsmodell ⁽¹⁾ för cystein 1:10/lysin 1:50

Medelvärde i procent för minskning av cystein och lysin	Reaktivitetsklass	DPRA-förutsägelse ⁽²⁾
0 % ≤ medelvärde % minskning ≤ 6,38 %	Ingen eller minimal reaktivitet	Negativ
6,38 % < medelvärde % minskning ≤ 22,62 %	Låg reaktivitet	Positiv
22,62 % < medelvärde % minskning ≤ 42,47 %	Måttlig reaktivitet	
42,47 % medelvärde % minskning ≤ 100 %	Hög reaktivitet	

⁽¹⁾ Siffrorna avser statistiskt genererade gränsvärden och har inget samband med mätningens precision.

⁽²⁾ En DPRA-förutsägelse bör övervägas inom ramen för en IATA och enligt anvisningarna i punkterna 9 och 12.

Det kan hända att testkemikalien (ämnet eller en eller flera komponenter av ett multikomponentämne eller en blandning) absorberar betydligt vid 220 nm och har samma retentionstid som peptiden (sameluering). Sameluering kan lösas genom att HPLC-konfigurationen justeras lite för att ytterligare separera testkemikaliens och peptidens elueringstid. Om en alternativ HPLC-konfiguration används för att lösa samelueringen bör dess motsvarighet till den validerade konfigurationen visas (t.ex. genom att testa kvalifikationsämnena i tillägg 2). Vid sameluering kan peptidens topp inte integreras och det är inte möjligt att beräkna procentvärdet för peptidens minskning. Om sameluering av sådana kemikalier förekommer med både cystein- och lysinpeptiderna bör analysen redovisas som "tvetydig". Om sameluering endast förekommer med lysinpeptiden kan prediktionsmodellen med cystein 1:10 i tabell 2 användas.

Tabell 2

Prediktionsmodell 1 med cystein 1:10 ⁽¹⁾

Cystein (Cys) % minskning	Reaktivitetsklass	DPRA-förutsägelse ⁽²⁾
0 % ≤ Cys % minskning ≤ 13,89 %	Ingen eller minimal reaktivitet	Negativ
13,89 % < Cys % minskning ≤ 23,09 %	Låg reaktivitet	Positiv
23,09 % < Cys % minskning ≤ 98,24 %	Måttlig reaktivitet	
98,24 % < Cys % minskning ≤ 100 %	Hög reaktivitet	

⁽¹⁾ Siffrorna avser statistiskt genererade gränsvärden och har inget samband med mätningens precision.

⁽²⁾ En DPRA-förutsägelse bör övervägas inom ramen för en IATA och enligt anvisningarna i punkterna 9 och 12.

Det kan finnas andra fall där överlappningen i retentionstiden mellan testkemikalien och en av peptiderna är ofullständig. I ett sådant fall kan procentvärdena för peptidens minskning uppskattas och användas i prediktionsmodellen med cystein 1:10/lysin 1:50, men det är inte möjligt att med noggrannhet tilldela testkemikalien en reaktivitetsklass.

En enda HPLC-analys för både cystein- och lysinpeptiden bör vara tillräcklig för testkemikalien om resultatet är otvetydigt. Om resultat nära gränsvärdet har använts för att skilja mellan positiva och negativa resultat (dvs. gränslösresultat) kan dock ytterligare testning vara nödvändig. I situationer där det genomsnittliga procentvärdet för minskning ligger inom intervallet 3 % till 10 % för prediktionsmodellen cystein 1:10/lysin 1:50 eller procentvärdet för cysteinets minskning ligger inom intervallet 9 % till 17 % för prediktionsmodellen med cystein 1:10, bör en andra körning övervägas och även en tredje om resultaten från de två första körningarna inte överensstämmer.

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie

— Monokomponentämne:

— Kemisk beteckning, såsom IUPAC- eller CAS-beteckningar, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturell formel och/eller andra beteckningar.

- Fysiskt utseende, vattenlöslighet, molekylärvikt och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Renhet, kemisk beteckning för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.
- Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).
- Testade koncentrationer.
- Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Multikomponentämne, UVCB och blandningar:
 - Karakteriseras så långt som möjligt genom t.ex. kemisk beteckning (se ovan), renhet, kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper (se ovan) hos beståndsdelarna, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
 - Fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
 - Molekylvikt eller uppskattad molekylvikt för blandning/polymerer med kända sammansättningar eller annan information som är relevant för utförandet av undersökningen.
 - Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).
 - Testade koncentrationer.
 - Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

Kontroller

- Positiv kontroll
 - Kemisk beteckning, såsom IUPAC- eller CAS-beteckningar, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturell formel och/eller andra beteckningar.
 - Fysiskt utseende, vattenlöslighet, molekylvikt och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
 - Renhet, kemisk beteckning för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.
 - Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).
 - Testade koncentrationer.
 - Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
 - Hänvisning till historiska positiva kontrollresultat som visar lämpliga acceptanskriterier för körningarna, i förekommande fall.
- Lösningsmedel/vehikel
 - Lösningsmedel/vehikel och förhållandet mellan dess beståndsdelar, i förekommande fall.
 - Kemiska beteckningar, såsom IUPAC- eller CAS-beteckningar, CAS-nummer och/eller andra beteckningar.
 - Renhet, kemisk beteckning för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.
 - Fysiskt utseende, molekylvikt och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper om andra lösningsmedel/vehiklar än de som anges i testmetoden används, i den mån sådan information finns tillgänglig.
 - Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

- Motivering för valet av lösningsmedel för varje testkemikalie.
- För acetonitril, resultat från testet av effekten på peptidens stabilitet.

Beredning av peptiderna, den positiva kontrollen och testkemikalien

- Karakterisering av peptidlösningarna (leverantör, parti, exakt vikt för peptiderna, tillsatt volym till stamlösningen).
- Karakterisering av den positiva kontrolllösningen (exakt vikt för det positiva kontrollämnet, tillsatt volym för testlösningen).
- Karakterisering av testkemikalielösningarna (exakt vikt för testkemikalien, tillsatt volym för testlösningen).

HPLC-instrumentinställningar samt analys

- Typ av HPLC-instrument, HPLC-kolonner och förkolonner, detektor och autosampler.
- Relevanta parametrar för HPLC-analysen, såsom kolonntemperatur, injektionsvolym, flödeshastighet och gradient.

Systemets lämplighet

- Topparea för peptiden vid 220 nm för varje standard samt referenskontroll A-replikat.
- Linjär kalibreringskurva i diagram, rapporterad r^2 .
- Peptidkoncentration för varje referenskontroll A-replikat.
- Medelvärde för peptidkoncentrationen (mM) för de tre referenskontrollerna, referenskontroll A, SD och CV.
- Peptidkoncentration för referenskontrollerna A och C.

Analyssekvens

- För referenskontroller:
 - Peptidens topparea vid 220 nm för varje B- och C-replikat.
 - Medelvärde för peptidens topparea vid 220 nm för de nio referenskontrollerna B och C i acetonitril, SD och CV (för referenskontrollernas stabilitet under analystiden).
 - För varje använt lösningsmedel, medelvärde för peptidens topparea vid 220 nm för de tre lämpliga referenskontrollerna C (för beräkning av procentvärdet för peptidens minskning).
 - För varje använt lösningsmedel, peptidkoncentration (mM) för de tre lämpliga referenskontrollerna C.
 - För varje använt lösningsmedel, medelvärde för peptidkoncentrationen (mM) för de tre lämpliga referenskontrollerna C, SD och CV.
- För positiv kontroll:
 - Peptidens topparea vid 220 nm för varje replikat.
 - Procentvärde för peptidens minskning för varje replikat.
 - Genomsnittligt procentvärde för peptidens minskning för de tre replikaten, SD och CV.
- För varje testkemikalie:
 - Förekomst av fällning i reaktionsblandningen i slutet av inkubationstiden, i förekommande fall. Om fällningen har återlösts eller centrifugerats.

- Förekomst av sameluering.
- Beskrivning av andra eventuella relevanta observationer, i förekommande fall.
- Peptidens topparea vid 220 nm för varje replikat.
- Procentvärde för peptidens minskning för varje replikat.
- Genomsnittligt procentvärde för peptidens minskning för de tre replikaten, SD och CV.
- Genomsnittligt procentvärde för cysteinets och lysinets minskning.
- Prediktionsmodell och DPRA-förutsägelse.

Kvalifikationsprövning

- I förekommande fall, det förfarande som använts för att visa att laboratoriet är kvalificerat för att tillämpa testmetoden (t.ex. genom testning av kvalifikationsämnen) eller för att visa att testmetoden kan reproduceras över tiden.

Diskussion av resultaten.

- Diskussion av de resultat som uppnått med DPRA-testmetoden.
- Diskussion av testmetodens resultat inom ramen för en IATA om annan relevant information finns tillgänglig.

Slutsats

LITTERATUR

- (1) Förenta nationerna (FN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Femte reviderade upplagan, FN New York och Genève, 2013. Finns 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 denna bilaga: Hudsensibilisering.
- (4) Kapitel B.42 i denna bilaga: LLNA-metoden (Local Lymph Node Assay):
- (5) Kapitel B.50 i denna bilaga: Hudsensibilisering: LLNA-metoden (Local Lymph Node Assay): DA.
- (6) Kapitel B.51 i denna bilaga: Hudsensibilisering: LLNA-METODEN (Local Lymph Node Assay) BrdU-ELISA
- (7) Adler m.fl. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85:367–485.
- (8) Gerberick m.fl. (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81:332–343.
- (9) Gerberick m.fl. (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. Finns på <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra>
- (11) Jaworska m.fl. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, publicerad online, 14 maj 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

- (12) Bauch m.fl. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 63: 489–504.
 - (13) Nukada m.fl. (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 m.fl. (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 och Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *Journal of Experimental Medicine* 64:625–639.
 - (16) Dupuis och Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.
 - (17) Lepoittevin m.fl. (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.
 - (18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74pp. Finns 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 m.fl. (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) protokoll 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Finns på <http://ecvam-dbal.m.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, nr 34. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris, Frankrike.
 - (22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Finns 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).
-

Tillägg 1

DEFINITIONER

Noggrannhet: Ett mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Den är ett mått på testmetodens prestanda och relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med "konkordans" för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (21).

AOP (Adverse Outcome Pathway): Sekvens av händelser, från målkemikalien eller en grupp av liknande kemikalier, genom den molekylära inledande händelsen och fram till ett in vivo-resultat av intresse (2).

Kalibreringskurva: Förhållandet mellan det experimentella responsvärdet och den analytiska koncentrationen (även kallad *standardkurva*) för ett känt ämne.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Variationskoefficient: Variationsmått som beräknas för en grupp av replikatdata genom att standardavvikelsen divideras med medelvärdet. Det kan multipliceras med 100 för att uttryckas som en procentandel.

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

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

Molekylär inledande händelse: Kemiskt inducerad störning i ett biologiskt system på molekylnivå, som identifieras som den utlösande händelsen i AOP.

Blandning: En blandning eller en lösning som består av två eller flera ämnen i vilken de inte reagerar (1)

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

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

Positiv kontroll: ett replikat som innehåller testsystemets alla komponenter och behandlas med ett ämne som veterligen inducerar positiv respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsens variationer kan bedömas över tiden, bör den kraftiga irritation som framkallas inte vara överdriven.

Referenskontroll: ett obehandlat prov som innehåller testsystemets alla komponenter, inbegripet lösningsmedlet eller vehikeln som behandlas tillsammans med testkemikaliebehandlade och andra kontrollprover i syfte att fastställa bakgrundsrespons för de prover som behandlas med testkemikalien upplöst i samma lösningsmedel eller vehikel. När detta prov testas med en parallell negativ kontroll, visar provet också huruvida lösningsmedlet eller vehikeln påverkar testsystemet.

Relevans: beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida detta förhållande är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl man genom testet korrekt kan mäta och förutse den biologiska effekt det gäller. Relevans omfattar också överväganden om en testmetods noggrannhet (konkordans) (21).

Tillförlitlighet: mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när den utförs med hjälp av samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier och repeterbarheten inom laboratorier (21).

Reproducerbarhet: Överensstämmelse mellan resultat som erhållits från testning av samma kemikalie med användning av samma testprotokoll (se tillförlitlighet) (21).

Sensitivitet: den andel av alla positiva/aktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testet. Det är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (21).

Specificitet: den andel av alla negativa/inaktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testet. Det är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (21).

Ämne: Kemiska ämnen och deras föreningar i naturlig eller framställd form, inklusive eventuella tillsatser nödvändiga för att bevara produktens stabilitet och sådana föroreningar som härrör från framställningsprocessen, men exklusive eventuella lösningsmedel som kan avskiljas utan att det påverkar ämnets stabilitet eller ändrar dess sammansättning (1).

Systemets lämplighet: Fastställande av instrumentens prestanda (t.ex. sensitivitet genom analys av en referensstandard innan analyssatsen körs (22).

Testkemikalie: Begreppet "testkemikalie" avser de testade kemikalierna.

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

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

Giltig testmetod: En testmetod som anses vara tillräckligt relevant och tillförlitlig för ett särskilt ändamål och baserar sig på vetenskapligt sunda principer. En testmetod är aldrig giltig i absolut bemärkelse, utan endast i förhållande till ett fastställt ändamål (21).

Tillägg 2

KVALIFIKATIONSÄMNEN FÖR ICE-TESTMETODEN

Chemico Hud Sensibilisering: Direkt Peptid Reaktivitetsanalys

Före rutinanvändning av ett test som följer denna testmetod bör laboratoriet påvisa den tekniska kvaliteten genom att korrekt identifiera klassificeringen av kemikalier som är farliga för ögonen för de 13 kemikalier som rekommenderas i tabell 1. Dessa ämnen har valts ut att representera responsskalan för ämnen som är farliga för ögonen enligt resultaten från in vivo-test på kaninögon (TG 405) och FN:s GHS-klassificeringssystem (dvs. GHS-kategorierna 1, 2A, 2B eller ingen klassificering) (4)(6). Till övriga kriterier hör att ämnena ska vara kommersiellt tillgängliga, att det finns tillgång till in vivo-referensdata av hög kvalitet och att det finns data av hög kvalitet från ICE-testmetoden in vitro. Referensdata finns i SSD (5) och i ICCVAM Background Review Document för ICE-testmetoden (9).

Tabell 1

Rekommenderade kvalifikationsämnen för att påvisa teknisk kvalitet med DPRA

Kvalifikations- ämnen	CASRN	Fysisk form	In vivo-förutsä- gelse ⁽¹⁾	DPRA-förutsä- gelse ⁽²⁾	Intervall ⁽³⁾ för % minskning av cysteinpeptider	Intervall ⁽³⁾ för % lysinpeptider minskning
2,4-Dinitroklor- bensen	97-00-7	Fast ämne	Sensibilise- rande (extremt)	Positiv	90–100	15–45
Oxazonon	15646-46-5	Fast ämne	Sensibilise- rande (extremt)	Positiv	60–80	10–55
Formaldehyd	50-00-0	Vätska	Sensibilise- rande (starkt)	Positiv	30–60	0–24
Bensylidenaceton	122-57-6	Fast ämne	Sensibilise- rande (måttligt)	Positiv	80–100	0–7
Farnesal	19317-11-4	Vätska	Sensibilise- rande (svag)	Positiv	15–55	0–25
2,3-Butandion	431-03-8	Vätska	Sensibilise- rande (svagt)	Positiv	60–100	10–45
1-Butanol	71-36-3	Vätska	Icke-sensibili- serande	Negativ	0–7	0–5,5
6-Metylkumarin	92-48-8	Fast ämne	Icke-sensibili- serande	Negativ	0–7	0–5,5

Kvalifikations- ämnen	CASRN	Fysisk form	In vivo-förutsä- gelse ⁽¹⁾	DPRA-förutsä- gelse ⁽²⁾	Intervall ⁽³⁾ för % minskning av cysteinpeptider	Intervall ⁽³⁾ för % lysinpeptider minskning
Mjölksyra	50-21-5	Vätska	Icke-sensibili- serande	Negativ	0–7	0–5,5
4-Metoxiacetofe- non	100-06-1	Fast ämne	Icke-sensibili- serande	Negativ	0–7	0–5,5

⁽¹⁾ In vivo-förutsägelserna angående fara och (styrka) baseras på LLNA-data (19). In vivo-styrka härleds med användning av de kriterier som föreslagits av ECETOC (23).

⁽²⁾ En DPRA-förutsägelse bör övervägas inom ramen för en IATA och enligt anvisningarna i punkterna 9 och 11.

⁽³⁾ Intervallen bestäms på grundval av minst tio minskningsvärden som genererats av sex sinsemellan oberoende laboratorier.

Tillägg 3

VÄGLEDNING OM UTFODRING OCH HANTERING AV FISKYNGEL OCH TESTDJUR FRÅN
REKOMMENDERADE ARTER

Kalibreringsstandarder och referenskontroller	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Utspädningsbuffert Referenskontroll A, rep 1 Referenskontroll A, rep 2 Referenskontroll A, rep 3
Samelueringskontroller	Samelueringskontroll 1 för testkemikalie 1 Samelueringskontroll 2 för testkemikalie 2
Referenskontroller	Referenskontroll B, rep 1 Referenskontroll B, rep 2 Referenskontroll B, rep 3
Första uppsättningen replikat	Referenskontroll C, rep 1 Referenskontroll C, rep 1 Prov 1, rep 1 Prov 2, rep 1
Andra uppsättningen replikat	Referenskontroll C, rep 2 Kanelaldehyd, rep 2 Prov 1, rep 2 Prov 2, rep 2
Tredje uppsättningen replikat	Referenskontroll C, rep 3 Kanelaldehyd, rep 3 Prov 1, rep 3 Prov 2, rep 3
Referenskontroller	Referenskontroll B, rep 4 Referenskontroll B, rep 5 Referenskontroll B, rep 6

Tre uppsättningar referenskontroller (dvs. prover som endast består av peptiden upplöst i lämpligt lösningsmedel) bör ingå i analyssekvensen.

Referenskontroll A: används för att kontrollera att HPLC-systemet är lämpligt.

Referenskontroll B: inbegrips i början och slutet av analyssekvensen för att kontrollera stabiliteten hos referenskontrollerna under analys tiden.

Referenskontroll C: inbegrips i analyssekvensen för att kontrollera att det lösningsmedel som använts för att lösa upp testkemikalien inte påverkar procentvärdet för peptidernas minskning.

B.60 Hudsensibilisering in vitro: Testmetoden ARE-Nrf2-uciferas

INLEDNING

Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 442D (2015). Hudsensibiliserande ämnen är ämnen som leder till en allergisk reaktion efter hudkontakt enligt definitionen i FN:s globala harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (1) och förordning (EU) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP-förordningen) ⁽¹⁾. Denna testmetod utgörs av ett förfarande in vitro (testmetoden ARE-Nrf2-luciferas) som används för att skilja mellan hudsensibiliserande ämnen och icke-hudsensibiliserande ämnen enligt FN:s GHS-klassificering (1) och CLP-förordningen.

Det råder allmän enighet om de viktigaste biologiska händelserna som utlöser hudsensibilisering. Den befintliga kunskapen om de kemiska och biologiska mekanismer som är förknippade med hudsensibilisering har sammanfattats i form av AOP (Adverse Outcome Pathway) (2), från den inledande molekyllära händelsen via de mellanliggande händelser som orsakar den negativa hälsoeffekten, nämligen allergisk kontaktdermatit hos människor och överkänslighet mot kontakt hos gnagare (2) (3). Den molekyllära inledande händelsen är en kovalent bindning av elektrofila ämnen till nukleofila centrum i hudproteiner. Den andra nyckelhändelsen i AOP sker i keratinocyterna och inkluderar inflammationsrespons samt genuttryck i samband med specifika cellsignalerande vägar, såsom ARE-beroende vägar (antioxidant/electrophile response element). Den tredje nyckelhändelsen är aktivering av dendritiska celler, vilket vanligen bedöms genom uttryck av specifika cellytmarkörer, kemokines och cytokines. Den fjärde nyckelhändelsen är spridning av T-celler, som bedöms indirekt i murintestmetoden LLNA(4).

Bedömning av hudsensibiliteten har normalt inneburit användning av försöksdjur. I de klassiska metoderna som baseras på marsvin, Magnusson Kligman Guinea Pig Maximisation Test (GPMT) och Buehler-testet (TM B.6 (5)), undersöks både induktions- och eliciteringsfaserna i hudsensibilisering. Ett murintest, Local Lymph Node Assay (LLNA, TM B.42 (4)) och dess två icke radioaktiva modifieringar, LLNA: DA (TM B.50 (6)) och LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (7)), som endast bedömer induktionsresponsen, har också vunnit erkännande eftersom de är mer fördelaktiga än marsvinstester ur djurskyddssynpunkt och ger en objektiv mätning av induktionsfasen i hudsensibilisering.

Mer nyligen har man kommit fram till att mekaniskt baserade tester in chemico och in vitro kan anses vara vetenskapligt giltiga för utvärdering av kemikaliers hudsensibiliserande faror. Det är dock nödvändigt att kombinera metoder utan försöksdjur (in silico, in chemico, in vitro) inom IATA (Integrated Approaches to Testing and Assessment) för att fullständigt ersätta de djurförsök som används i dagsläget, med tanke på AOP:s begränsade mekanistiska täckning av de testmetoder utan försöksdjur som finns tillgängliga för närvarande (2) (3).

Denna testmetod (ARE-Nrf2-luciferas) föreslås för att hantera den andra nyckelhändelsen som beskrivs i punkt 2. Hudsensibiliserande ämnen har rapporterats inducera gener som regleras av ARE (antioxidant response element) (8) (9). Små elektrofila ämnen såsom hudsensibiliserande ämnen kan agera mot sensorproteinet Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), t.ex. genom kovalent modifikation av dess cysteinrest, vilket leder till att det löser sig från transkriptionsfaktorn Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2). Den upplösta Nrf2 kan därefter aktivera ARE-beroende gener, t.ex. gener som kodar för fas II avgiftande enzymer (8) (10) (11).

Det enda ARE-Nrf2-luciferas-test in vitro som för närvarande täcks av denna testmetod är KeratinoSensTM-testet, för vilket valideringsstudier har slutförts (9) (12) (13), följt av en oberoende granskning som utförts av Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (EURL ECVAM) (14). KeratinoSensTM-testet ansågs vetenskapligt giltigt för att användas som en del av en IATA i syfte att skilja mellan hudsensibiliserande ämnen och icke-hudsensibiliserande ämnen för klassificering och märkning av farliga ämnen (14). Laboratorier som vill tillämpa denna testmetod kan erhålla den rekombinanta cellinje som används i KeratinoSensTM-testet genom ett licensavtal med testmetodens utvecklare (15).

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

Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN, TILLÄMPLIGHET OCH BEGRÄNSNINGAR

Eftersom aktiveringen av Keap1-Nrf2-ARE-vägen endast behandlar den andra nyckelhändelsen i AOP-hudsensibilisering är information från testmetoder som baseras på denna väg sannolikt inte tillräcklig om den används som enda underlag för att dra slutsatser om kemikaliers hudsensibiliserande potential. De data som genereras med denna testmetod bör därför övervägas inom ramen för integrerade strategier som IATA och kombineras med annan kompletterande information, t.ex. från in vitro-test rörande andra viktiga händelser i AOP-hudsensibiliseringen samt metoder utan testning, inklusive jämförelser från kemiskt analoga ämnen. Exempel på hur testmetoden ARE-Nrf2-luciferas kan användas i kombination med annan information finns i litteraturen (13) (16) (17) (18) (19).

Denna testmetod kan användas för att skilja mellan hudsensibiliserande kemikalier (dvs. GHS-/CLP-kategori 1) och icke-hudsensibiliserande ämnen inom ramen för IATA. Testmetoden kan inte användas fristående, vare sig för att dela in hudsensibiliserande ämnen i underkategorierna 1A och 1B enligt GHS/CLP, eller för att förutsäga styrka när det gäller säkerhetsbedömningsbeslut. Beroende på tillämpligt regelverk kan dock ett positivt resultat användas fristående för att klassificera kemikalier i GHS-/CLP-kategori 1.

Baserat på datauppsättningen från valideringsstudien samt intern testning som använts för den oberoende granskningen av testmetoden har KeratinoSensTM-testet visat sig vara överförbart till laboratorier med erfarenhet av cellodlingar. Testmetodens förväntade reproducerbarhet är i storleksordningen 85 % inom och mellan laboratorier (14). Noggrannheten (77 % – 155/201), sensitiviteten (78 % – 71/91) och specificiteten (76 % – 84/110) för KeratinoSensTM-testet när det gäller att skilja mellan hudsensibiliserande ämnen (dvs. GHS-/CLP-kategori 1) och icke-hudsensibiliserande ämnen jämfört med LLNA-resultat har beräknats med beaktande av all data som lämnats in till EURL ECVAM för utvärderingen och granskningen av testmetoden (14). Dessa siffror liknar nyligen publicerade siffror baserade på intern testning av cirka 145 ämnen (77 % noggrannhet, 79 % sensitivitet, 72 % specificitet) (13). Det är mer sannolikt att KeratinoSensTM-testet underskattar kemikalier som visar en låg till måttlig hudsensibiliserande styrka (dvs. GHS-/CLP-underkategori 1B) än kemikalier som visar en hög hudsensibiliserande styrka (dvs. GHS/CLP-underkategori 1A) (13) (14). Sammantaget visar informationen att KeratinoSensTM-testet bidrar till att identifiera risker för hudsensibilisering. De noggrannhetsvärden som anges här för KeratinoSensTM-testet som en fristående testmetod är dock endast vägledande, eftersom testmetoden bör övervägas i kombination med andra informationskällor inom ramen för en IATA och enligt beskrivningen i punkt 9. Vid utvärderingen av testmetoder med avseende på hudsensibilisering utan djurförsök bör man dessutom tänka på att både LLNA och andra djurförsök kanske inte fullständigt avspeglar situationen för de arter som är av intresse, t.ex. människor.

I denna metod avser begreppet "testkemikalie" endast testade kemikalier. Frågan om huruvida testmetoden ARE-Nrf2-luciferas är tillämplig på testning av ämnen och/eller blandningar tas inte upp här. De uppgifter som finns tillgängliga för närvarande visar att KeratinoSensTM-testet är tillämpligt på testkemikalier som täcker en rad olika organiska funktionella grupper, reaktionsmekanismer, hudsensibiliseringsstyrkor (detta har fastställts i in vivo-undersökningar) och fysikalisk-kemiska egenskaper (9) (12) (13) (14). De ämnen som testades var främst monokomponentämnen, även om en begränsad datamängd även finns om testning av blandningar (20). Testmetoden är emellertid tekniskt tillämplig på testning av multikomponentämnen och blandningar. Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man dock överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag. Vid testning av multikomponentämnen eller blandningar bör man även överväga eventuella störningar av cytotoxiska beståndsdelar i de observerade responserna. Testmetoden är tillämplig på lösliga testkemikalier eller testkemikalier som bildar en stabil dispersion (dvs. en kolloid eller en lösning i vilken testkemikalien inte stabiliseras eller separeras i olika faser från lösningsmedlet), antingen i vatten eller DMSO (inklusive alla komponenter i testkemikalien vid testning av multikomponentämnen eller blandningar).

Testkemikalier som inte uppfyller dessa villkor vid den högsta erforderliga slutkoncentrationen på 2 000 µM (jfr punkt 22) kan fortfarande testas vid lägre koncentrationer. I ett sådant fall kan resultat som uppfyller positivitetskriterierna i punkt 39 fortfarande användas som underlag för att identifiera testkemikalien som hudsensibiliserande. Negativa resultat vid koncentrationer på < 1 000 µM bör dock anses vara tvetydiga (se prediktionsmodellen i punkt 39). Vanliga ämnen med en LogP upp till 5 har testats med goda resultat, medan extremt hydrofoba ämnen med en LogP över 7 ligger utanför testmetodens kända tillämplighet (14). För ämnen med en LogP mellan 5 och 7 finns endast begränsad information tillgänglig.

Negativa resultat bör behandlas med försiktighet eftersom ämnen som endast reagerar på lysinrester kan detekteras som negativa av testmetoden. På grund av den begränsade metaboliska kapaciteten hos den använda cellinjen (21) och försöksbetingelserna kan även prohaptener (dvs. kemikalier som kräver enzymatisk aktivering, t.ex. via P450-enzym) och prehaptener (dvs. kemikalier som aktiveras av autooxidation) också ge negativa resultat, särskilt om de har en låg oxidationsgrad. Testkemikalier som inte är hudsensibiliserande men ändå är kemiska stressorer kan å andra sidan leda till falska positiva resultat (14). Mycket cytotoxiska testkemikalier kan inte alltid bedömas på ett tillförlitligt sätt. Testkemikalier som har en störande inverkan på luciferasenzymet kan störa luciferasens aktivitet i cellbaserade försök, vilket antingen orsakar skenbar inhibition eller ökad luminiscens (22). Fytoöstrogonkoncentrationer som är högre än 1 µM har t.ex. rapporterats störa luminiscenssignalerna i andra försök med rapporterade luciferasgener beroende på överaktivering av luciferasreportergenen (23). Därför krävs en noggrann undersökning av luciferasuttryck som erhålls vid höga koncentrationer av fytoöstrogener eller liknande kemikalier som misstänkts producera en fytoöstrogonliknande överaktivering av luciferasreportergenen (23). Om det finns bevis för att testmetoden inte är tillämplig på andra specifika testkemikalie kategorier bör den inte användas för dessa kategorier.

Förutom att KeratinoSens™-testet fungerar som underlag för att skilja mellan hudsensibiliserande ämnen och icke-hudsensibiliserande ämnen ger det även information om koncentration-respons som eventuellt kan bidra till bedömning av kemikaliers sensibiliseringspotential när försöket används inom ramen för integrerade strategier som IATA (19). Ytterligare arbete, företrädesvis baserat på tillförlitliga data för människor, krävs dock för att fastställa hur resultaten från KeratinoSens™-testet kan bidra till potensgradering (24) och indelning i underkategorier av hudsensibiliserande ämnen enligt GHS/CLP.

TESTPRINCIP

Testmetoden ARE-Nrf2-luciferas använder en immortaliserad vidhäftande cellinje som härletts från mänskliga keratinocyter av typen HaCaT som stabilt transfekteras med valfri plasmid. Cellinjen innehåller luciferasgenen under transkriptionskontroll av en konstituerande promotor som fusionerats med ett ARE-element från en gen som är känd för att uppregleras av kemikalier som orsakar kontaktdermatit (25) (26). Luciferassignalen avspeglar hudsensibiliserande ämnen som aktiverar endogena Nrf2-beroende gener. Luciferassignalens beroende i den rekombinanta cellinjen på Nrf2 har påvisats (27). Detta möjliggör kvantitativ mätning (genom luminiscensdetektion) av luciferasgenens induktion, med användning av väletablerade ljusproducerande luciferasubstrat som en indikator på Nrf2-transkriptionsfaktorns aktivitet i celler efter exponering för elektrofila ämnen.

Testkemikalier anses som positiva i KeratinoSens™-testet om de orsakar en statistiskt signifikant induktion av luciferasaktiviteten över en viss gräns (dvs. > 1,5-faldig eller en ökning på 50 %), under en fastställd koncentration som inte avsevärt påverkar cellens viabilitet (dvs. under 1 000 µM och vid en koncentration där cellens viabilitet är över 70 % (9) (12)). För detta ändamål fastställs det maximala förhållandet för luciferasaktivitetens induktion på lösningsmedelskontrollen (negativ kontroll) ($I_{\max}$). Eftersom cellerna exponeras för en rad koncentrationer av testkemikalien bör de koncentrationer som behövs för en statistiskt signifikant induktion av luciferasaktiviteten över gränsen (dvs. värdet $EC_{1.5}$) interpoleras från dos-responskurvan (se beräkningar i punkt 32). Parallella cytotoxicitetsmätningar bör dessutom göras för att bedöma huruvida induktionsnivåerna för luciferasaktiviteten förekommer vid subcytotoxiska koncentrationer.

Före rutin användning av ARE-Nrf2-luciferas-testet enligt denna testmetod bör laboratoriet visa teknisk kompetens med hjälp av de tio kvalifikationsämnen som anges i tillägg 2.

Prestandastandarder (PS) (28) finns tillgängliga för att underlätta valideringen av nya eller modifierade testmetoder för ARE-Nrf2-luciferas in vitro som liknar KeratinoSens™-testet, och för att möjliggöra snabba ändringar av denna testmetod för att inbegripa dessa. Ömsesidig acceptans av data (Mutual Acceptance of Data, MAD) enligt OECD-avtalet garanteras endast för testmetoder som validerats enligt PS, och om de har granskats och inbegripits i motsvarande testriktlinje av OECD.

FÖRFARANDE

Den enda metod som för närvarande omfattas av denna testmetod är det vetenskapligt giltiga KeratinoSens™-testet (9) (12) (13) (14). Standardrutiner (SOP) för KeratinoSens™-testet finns tillgängliga och bör användas när testmetoden genomförs och används i laboratoriet (15). Laboratorier som vill tillämpa denna testmetod kan erhålla den rekombinanta cellinje som används i KeratinoSens™-testet genom ett licensavtal med testmetodens utvecklare. I de följande punkterna ges en beskrivning av de viktigaste komponenterna och förfarandena för testmetoden ARE-Nrf2-luciferas.

Beredning av keratinocytodlingarna

En transgen cellinje med en stabil insertion av luciferasreportergenen under kontroll av ARE-elementet bör användas (t.ex. cellinjen KeratinoSens™). Efter mottagandet uppförökas cellerna (t.ex. 2 till 4 passager) och lagras frysta som en enhetlig stam. Celler från denna ursprungliga stam kan uppförökas upp till ett maximalt passageantal (dvs. 25 för KeratinoSens™) och används för rutintestning med användning av lämpligt underhållsmedium (för KeratinoSens™ används DMEM med serum och Geneticin).

För testning bör cellerna vara konfluenta till 80–90 %. Det är viktigt att se till att cellerna aldrig blir helt konfluenta. Cellerna skördas en dag före testningen och fördelas till 96-hålsplattor (10 000 celler/hål för KeratinoSens™). Det är viktigt att undvika att cellerna sedimenteras under sådden för att säkerställa att ett enhetligt antal celler fördelas mellan hålen. Om antalet inte är enhetligt kan detta steg ge upphov till en stor variation mellan hålen. För varje repetition används tre replikat för mätningen av luciferasaktiviteten och ett parallellt replikat används för cellviabilitetsförsöket.

Beredning av testkemikalien och kontrollämnena

Testkemikalien och kontrollämnena bereds på testningsdagen. För KeratinoSens™-testet löses testkemikalierna upp i dimetylsulfoxid (DMSO) till slutlig önskad koncentration (t.ex. 200 mM). DMSO-lösningarna kan anses vara självsteriliserande, vilket innebär att ingen sterilfiltrering krävs. Testkemikalier som inte är lösliga i DMSO löses upp i sterilt vatten eller odlingsmedium och lösningarna steriliseras t.ex. genom filtrering. För testkemikalier som inte har en fastställd molekylärvikt (MW) bereds en stamlösning till standardkoncentration (40 mg/ml eller 4 % (w/v)) i KeratinoSens™-testet. Om andra lösningsmedel än DMSO, vatten eller odlingsmedium används bör en tillfredsställande vetenskaplig motivering anges.

Baserat på testkemikaliens DMSO-stamlösningar görs serieutspädningar med användning av DMSO för att få fram 12 huvudkoncentrationer av den kemikalie som ska testas (från 0,098 till 200 mM i KeratinoSens™-testet). För testkemikalier som inte är upplösliga i DMSO görs de utspädningar som behövs för att få fram huvudkoncentrationerna med sterilt vatten eller ett sterilt odlingsmedium. Oberoende av vilket lösningsmedel som används späds huvudkoncentrationerna därefter ut 25-faldigt till odlingsmedier som innehåller serum och används slutligen för behandling med en ytterligare fyrfaldig utspädningsfaktor så att de slutliga koncentrationerna av den testade kemikalien sträcker sig från 0,98 till 2 000 µM i KeratinoSens™-testet. Alternativa koncentrationer kan användas om det motiveras (t.ex. i händelse av cytotoxicitet eller dålig upplösningsförmåga).

Den negativa kontroll (lösningsmedel) som används i KeratinoSens™-testet är DMSO (CAS-nr 67-68-5, ≥ 99 % renhet), för vilken sex hål per platta bereds. Den negativa kontrollen genomgår samma utspädning som huvudkoncentrationerna enligt punkt 22, så att den slutliga negativa kontrollen (lösningsmedel) är 1 % och man vet att den inte påverkar cellernas viabilitet. Den ska motsvara samma DMSO-koncentration som testkemikalien och den positiva kontrollen. När det gäller testkemikalier som inte är lösliga i DMSO, för vilka utspädningarna görs i vatten, måste DMSO-nivån i alla hål för den slutliga testlösningen justeras till 1 %, precis som för de andra testkemikalierna och kontrollämnena.

Den positiva kontroll som används i KeratinoSens™ -testet är kanelaldehyd (CAS-nr 14371-10-9, ≥ 98 % renhet), för vilken en serie av fem huvudkoncentrationer som sträcker sig från 0,4 till 6,4 mM bereds i DMSO (från en stamlösning på 6,4 mM). De späds ut på samma sätt som huvudkoncentrationerna enligt punkt 22, så att den slutliga koncentrationen för den positiva kontrollen sträcker sig från 4 till 64 µM. Andra lämpliga positiva kontroller, som helst bör ge EC_{1,5}-värden i mitten av intervallet, kan användas om historiska data finns tillgängliga för att härleda jämförbara acceptanskriterier.

Applicerings av testkemikalien och kontrollämnena

För varje testkemikalie och positivt kontrollämne krävs ett försök för att härleda en förutsägelse (positiv eller negativ). Försöken bör bestå av minst två oberoende repetitioner med tre replikat var (dvs. n = 6). Om resultaten för de två oberoende repetitionerna inte överensstämmer bör en tredje repetition med tre replikat utföras (dvs. n = 9). Varje oberoende repetition utförs på olika dagar med färsk stamlösningar av testkemikalier och nyskördade celler. Cellerna får däremot komma från samma passage.

Efter sådd enligt beskrivningen i punkt 20 odlas cellerna i 24 timmar i 96-hålsmikrotiterplattor. Därefter avlägsnas mediet och ersätts med färskt odlingsmedium (150 µl odlingsmedium innehållande serum, men utan Geneticin för KeratinoSens™), till vilket 50 µl av den 25-faldigt utspädda testkemikalien och kontrollämnena tillsätts. Minst ett hål per platta bör lämnas tomt (inga celler och ingen behandling) för att bedöma bakgrundsvärdena.

De behandlade plattorna inkuberas sedan i cirka 48 timmar vid 37 ± 1 °C med 5 % CO₂ i KeratinoSens™-testet. Det är viktigt att undvika förångning av flyktiga testkemikalier och korskontaminering mellan hålen av testkemikalierna, t.ex. genom att täcka över plattorna med folie före inkubationen med testkemikalierna.

Mätning av luciferasaktiviteten

Följande tre faktorer är kritiska för att säkerställa lämpliga luminiscensavläsningar:

- Luminometern bör vara tillräckligt känslig.
- Plattorna bör vara tillräckligt höga för att undvika ljuskorskontaminering.
- Luciferassubstratet bör ha ett tillräckligt ljusutfall för att säkerställa tillräcklig känslighet och låg variabilitet.

Före testning bör ett kontrollförsök enligt beskrivningen i tillägg 3 utföras för att se till att dessa tre villkor är uppfyllda.

Efter 48-timmarsexponeringen med testkemikalien och kontrollämnena i KeratinoSens™-testet tvättas cellerna med fosfatbuffrad koksaltlösning och relevant lyseringsbuffert för luminiscensavläsningarna tillsätts varje håll i 20 minuter i rumstemperatur.

Plattorna med cellyseringen placeras därefter i luminometern för avläsning. I KeratinoSens™-testet är avläsningen programmerad enligt följande: i) tillsätt luciferassubstratet till varje håll (dvs. 50 µl), ii) vänta i 1 sekund, och iii) integrera luciferasaktiviteten i 2 sekunder. Om alternativa inställningar används, t.ex. beroende på använd luminometermodell, bör detta motiveras. Dessutom kan ett glöds substrat användas, förutsatt att kvalitetskontrollförsöket i tillägg 3 är uppfyllt.

Bedömning av cytotoxicitet

För KeratinoSens™ cellviabilitetsförsök byts mediet ut efter exponeringstiden på 48 timmar mot färskt medium som innehåller MTT (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid, tiazolyblåtetrazoliumbromid, CAS-nr 298-93-1) och cellerna inkuberas i fyra timmar vid 37 °C med 5 % CO₂. Därefter avlägsnas MTT-mediet och cellerna lyseras (t.ex. genom att tillsätta 10 % SDS-lösning till varje håll) över natten. Efter skakning mäts absorptionen vid 600 nm med en fotometer.

DATA OCH RAPPORTERING

Utvärdering av data

Följande parametrar beräknas i KeratinoSens™-testet:

- Maximalt genomsnittligt induktionsförhållande avseende det värde som observerats för luciferasaktiviteten ($I_{\max}$) vid någon koncentration av den testade kemikalien och den positiva kontrollen.
- EC_{1,5}-värdet, som utgör den koncentration där induktionen av luciferasaktiviteten ligger över den 1,5-faldiga gränsen (dvs. 50 % ökad luciferasaktivitet).
- Koncentrationsvärdena IC₅₀ och IC₃₀ för minskning av cellens viabilitet med 50 % respektive 30 %.
- Induktionsförhållandet för luciferasaktivitet beräknas med ekvation 1 och det totala maximala induktionsförhållandet ($I_{\max}$) beräknas som genomsnittet av de individuella repetitionerna.

Ekvation 1:

$$\text{Induktionsförhållande} = \frac{(L_{\text{sample}} - L_{\text{blank}})}{(L_{\text{solvent}} - L_{\text{blank}})}$$

där

L_{sample} är luminiscensavläsningen i hålet med testkemikalien

L_{blank} är luminiscensavläsningen i hålet för blankprov, utan celler och utan behandling

L_{solvent} är den genomsnittliga luminiscensavläsningen i de håll som innehåller celler och lösningsmedel (negativ kontroll)

EC_{1,5} beräknas genom linjär interpolation enligt ekvation 2, och total EC_{1,5} beräknas som det geometriska medelvärde för de individuella repetitionerna.

Ekvation 2

$$EC_{1,5} = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1,5 - I_a}{I_b - I_a} \right) + C_a$$

där

C_a är den lägsta koncentrationen i μM med $> 1,5$ -faldig induktion

C_b är den högsta koncentrationen i μM med $< 1,5$ -faldig induktion

I_a är induktionsförhållandet mätt vid den lägsta koncentrationen med $> 1,5$ -faldig induktion (medelvärde för tre replikathål)

I_b är induktionsförhållandet vid den högsta koncentrationen med $< 1,5$ -faldig induktion (medelvärde för tre replikathål)

Viabilitet beräknas med ekvation 3:

Ekvation 3:

$$\text{Viabilitet} = \frac{(V_{\text{sample}} - V_{\text{blank}})}{V_{\text{solvent}} - V_{\text{blank}}} \times 100$$

där

V_{sample} är avläsningen av MTT-absorbans i hålet med testkemikalien

V_{blank} är avläsningen av MTT-absorbans i hålet för blankprov, utan celler och utan behandling

V_{solvent} är den genomsnittliga avläsningen av MTT-absorbans i de hål som innehåller celler och lösningsmedel (negativ kontroll)

IC_{50} och IC_{30} beräknas genom linjär interpolation enligt ekvation 4, och totala IC_{50} och IC_{30} beräknas som det geometriska medelvärdet för de individuella repetitionerna.

Ekvation 4:

$$IC_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100 - x) - V_a}{V_b - V_a} \right) + C_a$$

där

X är minskningen uttryckt i % vid den koncentration som ska beräknas (50 och 30 för IC_{50} och IC_{30})

C_a är den lägsta koncentrationen i μM med en minskning av viabiliteten på $> x$ %

C_b är den högsta koncentrationen i μM med en minskning av viabiliteten på $< x$ %

V_a är % viabilitet vid den lägsta koncentrationen med en minskning av viabiliteten på $> x$ %

V_b är % viabilitet vid den högsta koncentrationen med en minskning av viabiliteten på $< x$ %

Statistisk signifikans beräknas för varje koncentration som visar en $> 1,5$ -faldig induktion av luciferasaktiviteten (t. ex. genom testet two-tailed Students t-test). Luminiscensvärdena för de tre replikatproven jämförs med luminiscensvärdena i hålen med lösningsmedelskontroll (negativ kontroll) för att bestämma huruvida induktionen av luciferasaktivitet är statistiskt signifikant ($p < 0,05$). Den lägsta koncentrationen med $> 1,5$ -faldig induktion av luciferasaktivitet är det värde som bestämmer $EC_{1,5}$ -värdet. Det kontrolleras varje gång att detta värde ligger under IC_{30} -värdet, vilket visar att minskningen av cellernas viabilitet är mindre än 30 % vid det $EC_{1,5}$ -värde som bestämmer koncentrationen.

Data bör kontrolleras visuellt med hjälp av diagram. Om ingen tydlig dos-responskurva observeras, eller om den dos-responskurva som erhålls är bifasisk (gränsen på 1,5 korsas två gånger), bör försöket upprepas för att kontrollera om detta är specifikt för testkemikalien eller om det beror på en försöksartefakt. Om den bifasiska responsen är reproducerbar i ett oberoende försök bör det lägsta $EC_{1,5}$ -värdet (den koncentration när gränsen på 1,5 korsas för första gången) redovisas.

I de sällsynta fall där en statistiskt icke-signifikant induktion över 1,5 gånger observeras, följt av en högre koncentration med en statistiskt signifikant induktion, anses resultaten från denna repetition endast vara giltiga och positiva om den statistiskt signifikanta induktionen över gränsen på 1,5 erhöles för en icke cytotoxisk koncentration.

För testkemikalier som ger en 1,5-faldig eller högre induktion redan vid den lägsta testkoncentrationen på 0,98 μM fastställs $EC_{1,5}$ -värdet på $< 0,98$ genom en visuell kontroll av dos-responskurvan.

Kriterier för godkännande

Följande godkännandekriterier bör vara uppfyllda vid användning av KeratinoSensTM-testet. För det första bör den induktion av luciferasaktiviteten som erhålls med den positiva kontrollen, kanelaldehyd, vara statistiskt signifikant över gränsen på 1,5 (t.ex. med användning av ett T-test) i minst en av de testade koncentrationerna (från 4 till 64 μM).

För det andra bör $EC_{1,5}$ -värdet vara inom de två standardavvikelserna för testningsanläggningens historiska medelvärde (t.ex. mellan 7 μM och 30 μM baserat på valideringsdatauppsättningen), och bör uppdateras regelbundet. Den genomsnittliga induktionen i de tre replikaten för kanelaldehyd vid 64 μM bör dessutom vara mellan 2 och 8. Om det sistnämnda kriteriet inte är uppfyllt bör dos-responsen för kanelaldehyd kontrolleras noggrant och testen får endast godkännas om det finns en tydlig dos-respons med ökande induktion av luciferasaktivitet vid ökande koncentrationer för den positiva kontrollen.

Den genomsnittliga variationskoefficienten för luminiscensavläsningen för den negativa kontrollen (lösningsmedel) med DMSO bör slutligen vara under 20 % vid varje repetition som ska bestå av sex hål testade tre gånger. Om variationen är högre bör resultaten förkastas.

Tolkning av resultaten och förutsägbarhetsmodell

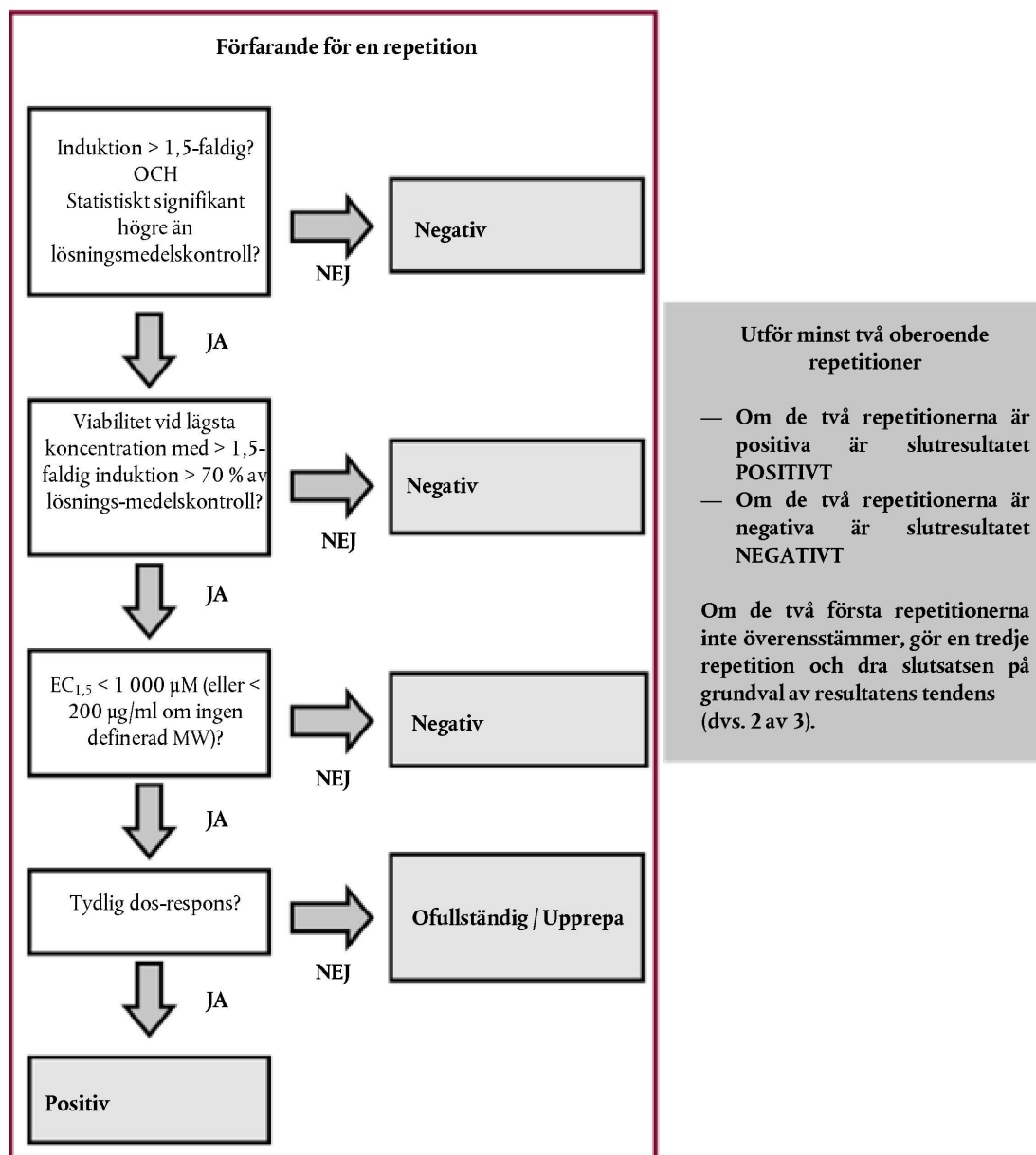
En förutsägelse med KeratinoSensTM anses vara positiv om alla de fyra villkor som anges nedan är uppfyllda i två av två eller i två av tre repetitioner. I annat fall anses förutsägelsen vara negativ (figur 1):

1. I_{max} är högre än ($>$) 1,5-faldig och skiljer sig på ett statistiskt signifikant sätt jämfört med lösningsmedelskontrollen (negativ kontroll) (fastställt genom ett tvåsidigt, oparat Students t-test);
2. Cellernas viabilitet är högre än ($>$) 70 % vid den lägsta koncentrationen med induktion av luciferasaktiviteten över 1,5 gånger (dvs. vid den koncentration som bestämmer $EC_{1,5}$).
3. $EC_{1,5}$ -värdet är lägre än ($<$) 1 000 μM (eller $<$ 200 $\mu\text{g/ml}$ för testkemikalier utan definierad MW).
4. Det finns en uppenbar övergripande dosrespons för luciferasinduktion (eller en bifasisk respons enligt punkt 33).

Om de tre första villkoren i en given repetition är uppfyllda men en tydlig dos-respons för luciferasinduktion inte kan observeras bör resultatet av den repetitionen anses vara tveetydigt och ytterligare testning kan krävas (figur 1). Ett negativt resultat som erhållits med koncentrationer $<$ 1 000 μM (eller $<$ 200 $\mu\text{g/ml}$ för testkemikalier utan definierad MW) bör också anses vara tveetydigt (se punkt 11).

Figur 1

Prediktionsmodell för KeratinoSens™-testet En KeratinoSens™-förutsägelse bör övervägas inom ramen för en IATA och enligt anvisningarna i punkterna 11 och 11.



I sällsynta fall kan testkemikalier som inducerar luciferasaktivitet som ligger mycket nära cytotoxiska nivåer vara positiva vid icke-cytotoxiska nivåer i vissa repetitioner (dvs. $EC_{1,5}$ bestämmer koncentrationer under ($<$) IC_{30}), och endast vid cytotoxiska nivåer i andra repetitioner (dvs. $EC_{1,5}$ bestämmer koncentrationer över ($>$) IC_{30}). Sådana testkemikalier ska testas om med en snävare dosresponsanalys med användning av en lägre utspädningsfaktor (t.ex. 1,33 eller $\bar{O}2$ (= 1,41) gånger mellan hålen) för att bestämma om induktionen har uppstått vid cytotoxiska nivåer eller ej (9).

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie

— Monokomponentämne:

— Kemisk beteckning, såsom IUPAC- eller CAS-beteckningar, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturell formel och/eller andra beteckningar.

- Fysiskt utseende, vattenlöslighet, DMSO-löslighet, molekylärvikt och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Renhet, kemisk beteckning för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.
- Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).
- Testade koncentrationer.
- Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
- Multikomponentämne, UVCB och blandningar:
 - Karakteriseras så långt som möjligt genom t.ex. kemisk beteckning (se ovan), renhet, kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper (se ovan) hos beståndsdelarna, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
 - Fysiskt utseende, vattenlöslighet, DMSO-löslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
 - Molekylvikt eller uppskattad molekylvikt för blandning/polymerer med kända sammansättningar eller annan information som är relevant för utförandet av undersökningen.
 - Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).
 - Testade koncentrationer.
 - Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

Kontroller

- Positiv kontroll
 - Kemisk beteckning, såsom IUPAC- eller CAS-beteckningar, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturell formel och/eller andra beteckningar.
 - Fysiskt utseende, vattenlöslighet, DMSO-löslighet, molekylvikt och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga och i förekommande fall.
 - Renhet, kemisk beteckning för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.
 - Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).
 - Testade koncentrationer.
 - Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
 - Hänvisning till historiska positiva kontrollresultat som visar lämpliga acceptanskriterier för körningarna, i förekommande fall.
- Negativ kontroll (vehikel)
 - Kemiska beteckningar, såsom IUPAC- eller CAS-beteckningar, CAS-nummer och/eller andra beteckningar.
 - Renhet, kemisk beteckning för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.
 - Fysiskt utseende, molekylvikt och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper om andra negativa kontroller/vehiklar än de som anges i testmetoden används, i den mån sådan information finns tillgänglig.
 - Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.
 - Motivering för valet av lösningsmedel för varje testkemikalie.

Testmetodens betingelser

- Namn och adress för sponsor, testanläggning och försöksledare.
- Beskrivning av testmetoden
- Cellinje, lagringsförhållanden och källa (t.ex. den anläggning de erhöles från).
- Antal passager och konfluensgrad för de celler som använts för testningen.
- Cellräkningsmetod för sådd före testning samt vidtagna åtgärder för att säkerställa en enhetlig fördelning av celler (jfr punkt 20).
- Luminometer (t.ex. modell), inklusive instrumentinställningar, använt luciferassubstrat och en demonstration av lämpliga luminiscensmätningar baserat på det kontrolltest som beskrivs i tillägg 3.
- Det förfarande som använts för att visa att laboratoriet är kvalificerat för att tillämpa testmetoden (t.ex. genom testning av kvalifikationsämnen) eller för att visa att testmetoden kan reproduceras över tiden.

Provningsförfarande

- Antal repetitioner och replikat
- Testkemikalies koncentrationer, appliceringsförfarande samt exponeringstid (om den skiljer sig från den rekommenderade tiden).
- Beskrivning av utvärderings- och beslutskriterierna.
- Beskrivning av acceptanskriterierna för undersökningen.
- Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet.

Resultat

- En sammanställning av de värden för $I_{\max}$, $EC_{1,5}$ och viabilitet (dvs. IC_{50} , IC_{30}) som erhållits för testkemikalien och den positiva kontrollen för varje repetition och medelvärden ($I_{\max}$: genomsnitt, $EC_{1,5}$ och viabilitetsvärden: geometriskt medelvärde) samt beräknad SD med användning av data från alla individuella repetitioner och en indikation på klassificeringen av testkemikalien enligt prediktionsmodellen.
- Den variationskoefficient som erhållits från luminiscensavlästningarna för den negativa kontrollen för varje försök.
- Ett diagram som visar dos-responskurvorna för induktionen av luciferasaktivitet samt viabilitet.
- Beskrivning av andra eventuella relevanta observationer, i förekommande fall.

Diskussion av resultaten.

- Diskussion av de resultat som uppnåtts med KeratinoSensTM-testet.
- Övervägande av testmetodens resultat inom ramen för en IATA om annan relevant information finns tillgänglig.

Slutsats

LITTERATUR

- (1) Förenta nationerna (FN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), femte reviderade utgåvan, FN New York och Genève, 2013. Finns på webbplatsen 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 nr 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 denna bilaga: Hudsensibilisering: LLNA-metoden (Local Lymph Node Assay).
- (5) Kapitel B.6 i denna bilaga: Hudsensibilisering.
- (6) Kapitel B.50 i denna bilaga: Hudsensibilisering: LLNA-METODEN (Local Lymph Node Assay): DA.
- (7) Kapitel B.51 i denna bilaga: Hudsensibilisering: LLNA-METODEN (Local Lymph Node Assay): 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; 398–408.
- (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, s. 42 ff. Finns 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. Finns på <http://ecvam-dbal.m.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, OECD, Paris.
- (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, Frankrike.
- (30) Nafta (Nordamerikanska frihandelsavtalet) (2012). Technical Working Group on Pesticides – (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. s. 186 ff. <http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf>
-

Tillägg 1

DEFINITIONER

Noggrannhet: Ett mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Den är ett mått på testmetodens prestanda och relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med "konkordans" för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (29).

AOP (Adverse Outcome Pathway): Sekvens av händelser, från målkemikalien eller en grupp av liknande kemikalier, genom den molekylära inledande händelsen och fram till ett in vivo-resultat av intresse (2).

ARE: *Antioxidant response element* (även kallat *EpRE, electrophile response element*), är ett responselement i den övre promoterregionen för många cytoprotektiva gener och fas II-gener. När ARE aktiveras av Nrf2 tjänar det som förbindelseled mellan dessa geners transkriptiva induktion.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Variationskoefficient: Variationsmått som beräknas för en grupp av replikatdata genom att standardavvikelsen divideras med medelvärdet. Det kan multipliceras med 100 för att uttryckas som en procentandel.

EC_{1,5}: interpolerad koncentration för en 1,5-faldig luciferasinduktion.

IC₃₀: en koncentration som framkallar en minskning av cellens viabilitet med 30 %.

IC₅₀: en koncentration som framkallar en minskning av cellens viabilitet med 50 %.

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

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

I_{max}: maximal induktionsfaktor för luciferasaktivitet jämfört med lösningsmedelskontrollen (negativ kontroll) mätt vid en testkemikaliekoncentration.

Keap1: *Kelch-like ECH-associated protein 1*, ett sensorprotein som kan reglera Nrf2-aktiviteten. Under icke-inducerade förhållanden riktar Keap1-sensorproteinet in sig på Nrf2-transkriptionsfaktorn för ubiquitinering och proteolytisk nedbrytning i proteasomen. Kovalent modifiering av de reaktiva cysteinresterna i Keap 1 av små molekyler kan leda till att Nrf2 löser sig från Keap1 (8) (10) (11).

Blandning: En blandning eller en lösning som består av två eller flera ämnen i vilken de inte reagerar (1)

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

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

Nrf2: Nukleär faktor (*erythroid-derived 2)-like 2*, är en transkriptionsfaktor i antioxidantresponsens väg. När Nrf2 inte är ubikvitinerad byggs den upp i cytoplasman och translokerar in i kärnorna, där den kombineras till ARE i den övre promoterregionen hos många cytoprotektiva gener och initierar deras transkription (8) (10) (11).

Positiv kontroll: ett replikat som innehåller testsystemets alla komponenter och behandlas med ett ämne som vederligen inducerar positiv respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsens variationer kan bedömas över tiden, bör den kraftiga irritation som framkallas inte vara överdriven.

Relevans: beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida detta förhållande är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl man genom testet korrekt kan mäta och förutse den biologiska effekt det gäller. Relevans omfattar också överväganden om en testmetods noggrannhet (konkordans) (29).

Tillförlitlighet: mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när den utförs med hjälp av samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier och repeterbarheten inom laboratorier (29).

Reproducerbarhet: Överensstämmelse mellan resultat som erhållits från testning av samma kemikalie med användning av samma testprotokoll (se tillförlitlighet) (29).

Sensitivitet: den andel av alla positiva/aktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testmetoden. Det är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (29).

Lösningsmedels-/vehikelkontroll: ett replikat som innehåller alla komponenter i testsystemet utom testkemikalien, men med det använda lösningsmedlet. Den används för att fastställa grundvärdet för de prover som behandlas med testkemikalien upplöst i samma lösningsmedel.

Specificitet: den andel av alla negativa/inaktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testmetoden. Den är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (29).

Ämne: Kemiska ämnen och deras föreningar i naturlig eller framställd form, inklusive eventuella tillsatser nödvändiga för att bevara produktens stabilitet och sådana föroreningar som härrör från framställningsprocessen, men exklusive eventuella lösningsmedel som kan avskiljas utan att det påverkar ämnets stabilitet eller ändrar dess sammansättning (1).

Testkemikalie: Begreppet "testkemikalie" avser de testade kemikalierna.

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

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

Giltig testmetod: En testmetod som anses vara tillräckligt relevant och tillförlitlig för ett särskilt ändamål och baserar sig på vetenskapligt sunda principer. En testmetod är aldrig giltig i absolut bemärkelse, utan endast i förhållande till ett fastställt ändamål (29).

Tillägg 2

KVALIFIKATIONSÄMNINGEN

Hudsensibilisering in vitro: Testmetoden ARE-Nrf2-luciferas

Före rutinanvändning av denna testmetod bör laboratoriet påvisa den tekniska kvaliteten genom att korrekt erhålla den förväntade KeratinoSens™-prediktionen för de tio kvalifikationsämnen som rekommenderas i tabell 1 och genom att erhålla minskningsvärden för EC_{1,5} och IC₅₀ som håller sig inom respektive referensintervall för minst åtta av de tio kvalifikationsämnena. Dessa kvalifikationsämnen har valts för att representera responsintervallet för hudsensibiliserande faror. Andra urvalskriterier är kommersiell tillgänglighet, tillgång till in vivo-referenser av hög kvalitet och tillgång till in vitro-data av hög kvalitet från KeratinoSens™-testet.

Tabell 1

Rekommenderade ämnen för att påvisa teknisk kvalitet hos försöket KeratinoSens™

Kvalifikations- ämnen	CASRN	Fysikalisk form	In vivo-förutsä- gelse ⁽¹⁾	KeratinoSens™ Förutsägelse ⁽²⁾	EC _{1,5} (µM) refe- rensintervall ⁽³⁾	IC ₅₀ (µM) refe- rensintervall ⁽³⁾
Isopropanol	67-63-0	Vätska	Ej sensibilise- rande	Negativ	> 1 000	> 1 000
Salicylsyra	69-72-7	Fast ämne	Ej sensibilise- rande	Negativ	> 1 000	> 1 000
Mjölksyra	50-21-5	Vätska	Ej sensibilise- rande	Negativ	> 1 000	> 1 000
Glycerol	56-81-5	Vätska	Ej sensibilise- rande	Negativ	> 1 000	> 1 000
Kanelalkohol	104-54-1	Fast ämne	Sensibilise- rande (svagt)	Positiv	25–175	> 1 000
Etylenglykoldime- takrylat	97-90-5	Vätska	Sensibilise- rande (svagt)	Positiv	[5–125]	500
2-mercaptobenso- tiazol	149-30-4	Fast ämne	Sensibilise- rande (mode- rat)	Positiv	25–250	> 500
Metyldibromgluta- ronitril	35691-65-7	Fast ämne	Sensibilise- rande (starkt)	Positiv	< 20	20–100
4-metylaminofo- nolsulfat	55-55-0	Fast ämne	Sensibilise- rande (starkt)	Positiv	< 12.5	20–200
2,4-dinitro-klor- bensen	97-00-7	Fast ämne	Sensibilise- rande (ex- tremt)	Positiv	< 12.5	5–20

⁽¹⁾ In vivo-förutsägelserna angående fara (och potential) baseras på LLNA-data (13). In vivo-kraft härleds med användning av de kriterier som föreslagits av ECETOC (24).

⁽²⁾ En KeratinoSens™-förutsägelse bör övervägas inom ramen för en IATA och enligt anvisningarna i punkterna 9 och 11 i denna testmetod.

⁽³⁾ Baserat på historiska observerade värden (12).

Tillägg 3

KVALITETSKONTROLL FÖR LUMINISCENSMÄTNING

Grundläggande försök för att säkerställa optimala luminiscensmätningar i KeratinoSens™-testet

Följande tre parametrar är kritiska för att se till att tillförlitliga resultat erhålls med luminometern:

- Tillräcklig känslighet som ger en stabil bakgrund i kontrollhålen.
- Ingen gradient över plattan till följd av långa avläsningsperioder.
- Ingen ljusförorening i närliggande hål från starkt aktiva hål.

Innan testningen inleds bör man ha lämpliga luminiscensmätningar, genom att testa en konfiguration för kontrollplattan enligt beskrivningen nedan (tredubbel analys).

Konfiguration för plattan vid första övningsförsöket

	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 1000	EGDMA 2000
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	Blank- prov

EGDMA = etylenglykoldimetakrylat (CAS-nr: 97-90-5) en starkt inducerande kemikalie

CA = kanelaldehyd, positiv referens (CAS-nr: 104-55-2)

Kvalitetskontrollanalysen bör visa följande:

- En tydlig dos-respons i rad D, med $I_{\max} > 20$ -faldig över bakgrunden (i de flesta fall nås $I_{\max}$ -värden mellan 100 och 300).

- Ingen dos-respons i raderna C och E (inget induktionsvärde över 1,5 (helst inte över 1,3) på grund av eventuell ljusförorening, särskilt nära starkt aktiva hål i EGDMA-raden.
 - Ingen statistiskt signifikant skillnad mellan raderna A, B, C, E, F och G (dvs. ingen gradient över plattan).
 - Variation i någon av raderna A, B, C, E, F och G, DMSO-hålen i rad H bör vara under 20 % (dvs. stabil bakgrund).
-

B.61 Testmetoden fluoresceinläckage för identifiering av ämnen som är frätande och kraftigt irriterande för ögonen

INLEDNING

Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 460 (2012). Testmetoden fluoresceinläckage (FL) är en testmetod in vitro som kan användas under särskilda omständigheter och med specifika begränsningar för att klassificera kemikalier (ämnen och blandningar) som frätande och kraftigt irriterande för ögonen enligt definitionen i FN:s globala harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (kategori 1), förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP-förordningen) ⁽¹⁾ (kategori 1) och amerikanska Environmental Protection Agency (EPA) (kategori I) (1)(2). Vid tillämpningen av denna testmetod definieras kraftigt ögonirriterande kemikalier som kemikalier som kan orsaka vävnadsskada i ögat efter tillförsel som inte är reversibel inom 21 dagar eller allvarliga synförsämringar. Kemikalier som är frätande orsakar irreversibla vävnadsskador i ögat. Dessa kemikalier klassificeras som GHS-kategori 1, CLP-kategori 1 eller EPA-kategori I.

Även om FL-testmetoden inte anses vara en fullgod ersättning för in vivo-ögonstest på kanin, rekommenderas testmetoden som en del av en strategi för stegvis testning när det gäller rättslig klassificering och märkning. FL-testmetoden rekommenderas som ett inledande steg inom ramen för en uppifrån och ned-strategi för att identifiera frätande/kraftigt irriterande kemikalier, särskilt för begränsade typer av kemikalier (dvs. vattenlösliga ämnen och blandningar) (3)(4).

Det är allmänt vedertaget att inget ögonirritationstest in vitro inom överskådlig framtid kommer att kunna ersätta ögonstest in vivo (TM B.5 (5)) för att förutsäga alla typer av ögonirritation för olika kemiska klasser. Strategiska kombinationer av flera alternativa testmetoder inom ramen för en (differentierad) teststrategi kan dock ersätta ögonstest in vivo (4). Uppifrån och ned-strategin (4) är utformad för att användas när en kemikalier, baserat på befintlig information, förväntas ha en hög irritationspotential.

Baserat på den prediktionsmodell som anges i punkt 35 kan FL-testmetoden identifiera kemikalier med begränsat tillämpningsområde som frätande/kraftigt irriterande för ögonen (GHS-kategori 1, CLP-kategori 1 och EPA-kategori I) utan ytterligare testning. Detsamma antas för blandningar, även om blandningar inte användes i valideringen. FL-testmetoden kan därför användas för att bestämma hur irriterande/frätande kemikalier är för ögonen enligt den stegvisa teststrategin i TM B.5 (5). En kemikalie som inte förutsägs vara frätande eller kraftigt irriterande enligt FL-testmetoden måste dock testas enligt en eller flera kompletterande testmetoder (in vitro och/eller in vivo) som gör det möjligt att exakt identifiera i) kemikalier som in vitro ger en falsk negativ respons som frätande/kraftigt irriterande enligt FL (GHS-kategori 1, CLP-kategori 1 och EPA-kategori I), ii) kemikalier som inte är klassificerade som frätande/irriterande (GHS Ingen klassificering, CLP Ingen klassificering och EPA-kategori IV), och/eller iii) kemikalier som är måttligt/milt irriterande (GHS-kategorierna 2A och 2B, CLP-kategori 2 och EPA-kategorierna II och III).

Syftet är att beskriva de metoder som används för att utvärdera en testkemikalies potentiellt frätande eller kraftigt irriterande egenskaper på ögon, uppmätta som dess förmåga att orsaka skada på ett impermeabelt konfluent monolager av epitelceller. Opåverkad permeabilitet är en viktig epitelfunktion, t.ex. i ögats bindhinna (konjunktiva) och hornhinnan. Epitelets permeabilitet begränsas genom s.k. täta fogar (tight junctions). Ökad permeabilitet i hornhinnans epitel in vivo kan korreleras med den grad av inflammation och ytskador som observeras när ögonirritationen utvecklas.

I FL-testmetoden mäts toxiska effekter efter en kort tids exponering för testkemikalien i form av en ökning av permeabiliteten hos natriumfluorescein genom epitel-monolagret hos MDCK-celler (Madin-Darby Canine Kidney) som odlas på permeabla insatser. Den mängd fluoresceinläckage som uppstår är proportionell mot den kemiskt inducerade skadan på de täta fogarna, de desmosomala fogarna och cellmembranen, och kan användas för att uppskatta en testkemikalies toxiska potential. I tillägg 1 finns ett diagram över MDCK-celler som odlats på ett insatsmembran för FL-testmetoden.

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

Definitioner av begreppen finns i tillägg 2.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

Testmetoden baserar sig på INVITTOX-protokoll nr 71 (6) som har utvärderats i en internationell valideringsstudie av Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (ECVAM) i samarbete med amerikanska ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*) och det japanska centret för validering av alternativa metoder (JaCVAM).

FL-testmetoden rekommenderas inte för identifiering av kemikalier som bör klassificeras som mildt/måttligt irriterande eller kemikalier som inte bör klassificeras som ögonirriterande (ämnen och blandningar) dvs. GHS-kategori 2A/2B, Ingen klassificering, CLP-kategori 2, Ingen klassificering och EPA-kategori II/III/IV), vilket har påvisats av valideringsstudien (3) (7).

Testmetoden är endast tillämplig på vattenlösliga kemikalier (ämnen och blandningar). Kraftigt ögonirriterande potential hos vattenlösliga kemikalier och/eller kemikalier vars toxiska effekt inte påverkas av utspädning kan generellt förutsägas korrekt med användning av FL-testmetoden (7). För att en kemikalie ska kategoriseras som vattenlösning bör den, under försöksbetingelser, vara lös i steril kalciumhaltig HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) (vid en koncentration på 1,0–1,8 mM), utan fenolrött, vid en koncentration på ≥ 250 mg/ml (en dos över gränsdosen på 100 mg/ml). Om testkemikalien är lös under 100 mg/ml, men framkallar en FL-induktion på 20 % redan vid den koncentrationen (dvs. FL20 < 100 mg/ml), kan den fortfarande kategoriseras som GHS-kategori 1 eller EPA-kategori I.

De identifierade begränsningarna hos denna testmetod utesluter starka syror och baser, cellfixativ och starkt flyktiga kemikalier från tillämpningsområdet. Sådana kemikalier har mekanismer som inte mäts av FL-testmetoden, t.ex. omfattande koagulering, förtvålning eller specifika reaktiva kemiska egenskaper. Andra identifierade begränsningar hos metoden baseras på resultaten för färgade och viskösa testkemikaliers prediktionsförmåga (7). Båda typerna av kemikalier anses vara svåra att avlägsna från monolagret efter den korta exponeringsperioden. Testmetodens prediktivitet skulle därför kunna förbättras om fler tvättningssteg används. Fasta kemikalier som löses upp i vätska har en benägenhet att fällas ut och det kan vara svårt att bestämma den slutliga koncentrationen till cellerna. När kemikalier från dessa kemiska och fysikaliska klasser utesluts ur databasen får man en klart bättre noggrannhet för FL i EU-, EPA- och GHS-klassificeringssystemen (7).

Om man ser till syftet med detta test (dvs. att enbart identifiera ämnen som är frätande eller kraftigt irriterande för ögonen) är falska negativa värden (se punkt 13) inte kritiska, eftersom sådana kemikalier därefter testas med andra tillbörligt validerade in vitro-test eller på kaniner, beroende på kraven i tillämpliga bestämmelser, med tillämpning av en strategi med stegvis testning och enligt principen om sammanvägd bedömning (5) (se även punkterna 3 och 4).

Andra identifierade begränsningar hos FL-testmetoden baseras på falska negativa och falska positiva värden. När FL-metoden används inom ramen för en uppifrån och ned-strategi för att identifiera vattenlösliga ämnen och blandningar som är frätande/kraftigt irriterande för ögonen (GHS-kategori 1, CLP-kategori 1 och EPA-kategori I) sträcker sig de falska positiva värdena för FL-testmetoden från 7 % (7/103, GHS och CLP) till 9 % (9/99, EPA) och de falska värdena från 54 % (15/28, EPA) till 56 % (27/48, GHS och CPL) jämfört med in vivo-resultat. Kemikaliegrupper som visar falska positiva och/eller falska negativa resultat i FL-testmetoden definieras inte här.

Vissa tekniska begränsningar är specifika för MDCK-cellkulturen. De täta fogar som blockerar passagen för natriumfluoresceinfärgen genom monolagret blir alltmer utsatta när cellpassageantalet ökar. Ofullständig information om täta fogar leder till ökad FL i den icke-behandlade kontrollen. Därför är det viktigt att fastställa ett maximalt godtagbart läckage i den icke-behandlade kontrollen (se punkt 38: 0 % läckage). Precis som för alla in vitro-test kan cellerna transformeras med tiden. Därför är det viktigt att ange passageintervall för försöken.

Det gällande tillämpningsområdet kan utökas i vissa fall, dock endast efter en analys av en expanderad datauppsättning av undersökta testkemikalier, företrädesvis inhämtad genom testning (3). Denna testmetod kommer att uppdateras allteftersom ny information och data övervägs.

Laboratorier som tar denna testmetod i bruk för första gången bör använda de kvalifikationskemikalier som förtecknas i tillägg 3. Laboratorierna kan använda dessa kemikalier för att påvisa sin tekniska kompetens att genomföra FL-test innan det lämnar in FL-testdata avsedda för lagstadgad faroklassificering.

TESTPRINCIP

FL-testmetoden är ett in vitro-test som baseras på cytotoxicitet och cellfunktioner. Det utförs på ett konfluent monolager av tubulära epitelceller av typen MDCK CB997, som odlas på halvgenomträngliga insatser för att återskapa ett icke-spridande tillstånd hos hornhinnans epitel in vivo. MDCK-cellinjen är väletablerad och bildar täta fogar och desmosomala fogar som liknar de fogar som finns på den apikala sidan av bindhinnans och hornhinnans epitel. Täta fogar och desmosomala fogar in vivo förhindrar att lösningar och främmande material penetrerar hornhinnans epitel. Förlust av impermeabilitet hos epitel på grund av skadade täta fogar (tight junctions) och desmosomala fogar är en av de tidiga händelserna i kemiskt inducerad ögonirritation.

Testkemikalien appliceras på ett konfluent cellager som odlas på den apikala sidan av insatsen. En kort exponeringstid på 1 minut används rutinmässigt för att avspegla normal minskningshastighet vid human exponering. En fördel med den korta exponeringsperioden är att vattenbaserade ämnen och blandningar kan testas rena om de är lätta att avlägsna efter exponeringsperioden. Detta möjliggör mer direkta jämförelser av resultaten med de kemiska effekterna på människor. Därefter avlägsnas testkemikalien och en icke-toxisk starkt fluorescerande natriumfluoresceinfärg appliceras på den apikala sidan av monolagret i 30 minuter. Den skada testkemikalien orsakar på de täta fogarna bestäms av den mängd fluorescein som läcker igenom cellagret under en viss period.

Mängden natriumfluoresceinfärg som passerar genom monolagret och insatsmembranet till en fast volym av lösning i hålet (som natriumfluoresceinfärgen läcker in i) bestäms genom en spektrofluorimetrisk mätning av fluoresceinkoncentrationen i hålet. Mängden fluoresceinläckage (FL) beräknas med hänsyn till avläsningar av fluorescensintensiteten (FI) från två kontroller: en blankkontroll och en kontroll av maximalt läckage. Procentandelen läckage och därför graden av skada på de täta fogarna uttrycks, i förhållande till dessa kontroller, för varje uppsättning koncentrationer av testkemikalien. Därefter beräknas FL₂₀ (dvs. den koncentration som orsakar 20 % FL i förhållande till det värde som registrerats för det obehandlade konfluenta monolagret och insatser utan celler). FL₂₀-värdet (mg/ml) används i prediktionsmodellen för att identifiera frätande och kraftigt irriterande kemikalier (se punkt 35).

Återhämtning är en viktig del av testkemikaliens toxicitetsprofil, vilket också bedöms genom ögonirritationstest in vivo. Preliminära analyser har visat att återhämtningsdata (upp till 72 timmar efter kemisk exponering) eventuellt kan öka prediktionsförmågan för INVITTOX protokoll 71. Ytterligare utvärderingar är dock nödvändiga och det skulle därför behövas kompletterande data, företrädesvis från ytterligare testning (6). Denna testmetod kommer att uppdateras allteftersom ny information och data övervägs.

FÖRFARANDE

Beredning av cellmonolager

Monolagret för MDCK CB997-cellerna bereds med nästan konfluenta celler som odlas i cellodlingskolvar i DMEM/näringsmix F12 (1 × koncentrat med L-glutamin, 15 mM HEPES, kalcium (vid en koncentration på 1,0–1,8 mM) och 10 % värmeinaktiverat FCS/FBS). Det är viktigt att alla medier/lösningar som används i FL-testet innehåller kalcium vid en koncentration på mellan 1,8 mM (200 mg/l) och 1,0 mM (111 mg/l) för att se till att täta fogar bildas och för att säkerställa deras integritet. Cellpassageantalet bör kontrolleras för att se till att täta fogar bildas på ett enhetligt och reproducerbart sätt. Cellerna bör företrädesvis hålla sig inom passageintervallet 3–30 från upptining eftersom celler inom detta passageintervall har liknande funktionalitet, vilket gör det lättare att reproducera försöksresultaten.

Innan FL-testmetoden utförs lösgör man cellerna från kolven med trypsinering och centrifugering. Därefter sås en lämplig mängd celler i insatser som är placerade i 24-hålsplattor (se tillägg 1). Insatser med 12 mm diameter och ett membran av blandade cellulosaestrar med en tjocklek på 80–150 µm och en porstorlek på 0,45 µm bör användas för att så cellerna. I valideringsstudien användes insatser av typen Millicell-HA 12 mm. Insatsens och membrantypens egenskaper är viktiga eftersom de kan påverka celltillväxten och den kemiska bindningen. Vissa typer av kemikalier kan binda sig till insatsmembranet Millicell-HA, vilket kan påverka tolkningen av resultaten. Kvalifikationskemikalier (se tillägg 3) bör användas för att påvisa motsvarighet om andra membran används.

Kemisk bindning till insatsmembranet är vanligare för katjoniska kemikalier, t.ex. bensalkoniumklorid, som dras till det laddade membranet (7). Den kemiska bindningen till insatsmembranet kan öka kemikaliens exponeringsperiod, vilket leder till en överskattning av dess toxiska potential, men kan även fysiskt minska fluoresceinläckaget genom insatsen eftersom färgen binds till den katjoniska kemiska bindningen till insatsmembranet, vilket leder till en underskattning av kemikaliens toxiska potential. Detta kan enkelt övervakas genom att man endast exponerar membranet för den testade kemikaliens toppkoncentration och sedan tillsätter natriumfluoresceinfärg vid normal koncentration under standardtiden (ingen cellkontroll). Om natriumfluoresceinfärgen binds är insatsmembranet gult efter det att testmaterialet har tvättats av. Det är därför viktigt att känna till testkemikaliens bindande egenskaper för att kunna tolka kemikaliens effekter på cellerna.

Cellsådden på insatserna bör skapa ett konfluent monolager vid tidpunkten för den kemiska exponeringen: $1,6 \times 10^5$ celler bör tillsättas per insats (400 µl av en cellsuspension med en densitet på 4×10^5 celler/ml). Under dessa förhållanden erhålls ett konfluent monolager vanligen efter 96 timmars odling. Insatserna bör undersökas visuellt före sådd för att säkerställa att eventuella skador som registrerats vid den visuella kontroll som beskrivs i punkt 30 beror på hanteringen.

MDCK-celloddlingarna bör förvaras i inkubatorer i en fuktig atmosfär, vid $5\% \pm 1\%$ CO₂ och 37 ± 1 °C. Cellerna får inte vara förorenade med bakterier, virus, mykoplasma eller svamp.

Applicering av test- och kontrollkemikalier

En ny stamlösning av testkemikalien bör beredas för varje försök och användas inom 30 minuter från beredningen. Testkemikalierna bör beredas i en kalciumhaltig HBSS (vid en koncentration på 1,0–1,8 mM) utan fenolrött för att undvika bindning av serumproteiner. Testkemikaliens löslighet vid 250 mg/ml i HBSS bör bedömas före testning. Om kemikalien bildar en stabil suspension eller emulsion vid denna koncentration (dvs. att kemikalien förblir enhetlig och varken stabiliseras eller separeras i fler än en fas) under 30 minuter kan HBSS fortfarande användas som lösningsmedel. Om kemikalien är olöslig i HBSS vid denna koncentration bör dock andra testmetoder än FL övervägas. Användning av lätt mineralolja som lösningsmedel om kemikalien är olöslig i HBSS bör övervägas med försiktighet eftersom det inte finns tillräckliga uppgifter tillgängliga för att dra en slutsats om hur FL-testet fungerar under sådana betingelser.

Alla kemikalier som ska testas bereds i steril kalciumhaltig HBSS (vid en koncentration på 1,0–1,8 mM), utan fenolrött, från stamlösningen, vid fem fasta koncentrationer som späds ut på grundval av vikt per volym: 1, 25, 100, 250 mg/ml och en utspädd eller mättad lösning. Vid testning av fasta kemikalier bör dessutom en mycket hög koncentration på 750 mg/ml användas. Denna koncentration av kemikalien kan behöva appliceras på cellerna med hjälp av en positiv deplacementpipett. Om toxiciteten visar sig vara mellan 25 och 100 mg/ml bör följande kompletterande koncentrationer testas två gånger: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. FL₂₀-värdet bör härledas från dessa koncentrationer under förutsättning att acceptanskriterierna har uppfyllts.

Testkemikalierna appliceras på de konfluenta cellmonolagren när cellodlingsmediet har avlägsnats och cellmonolagren har tvättats två gånger med steril, varm (37 °C) kalciumhaltig HBBS (vid en koncentration på 1,0–1,8 mM) utan fenolrött. Före detta har filtren kontrollerats visuellt för att se om det finns tidigare skador som felaktigt kan tillskrivas eventuell inkompatibilitet med testkemikalierna. Minst tre replikat ska användas för varje koncentration av testkemikalien och för kontrollerna i varje omgång. Efter en minuts exponering i rumstemperatur avlägsnas testkemikalien försiktigt genom aspiration, monolagret tvättas två gånger med steril, varm (37 °C) kalciumhaltig HBBS (vid en koncentration på 1,0–1,8 mM) utan fenolrött, och fluoresceinläckaget mäts omedelbart.

Parallella negativa (NC) och positiva kontroller (PC) bör användas i varje körning för att visa att monolagrets integritet (NC) och cellernas sensitivitet (PC) håller sig inom ett fastställt historiskt acceptansintervall. Den föreslagna kemikalien för positiva kontroller är Brij 35 (CAS-nr 9002-92-0) vid 100 mg/ml. Denna koncentration bör ge omkring 30 % fluoresceinläckage (det godtagbara intervallet är 20–40 % fluoresceinläckage, dvs. skador på cellagret). Den föreslagna kemikalien för negativa kontroller är kalciumhaltig HBBS (vid en koncentration på 1,0–1,8 mM) utan fenolrött (obehandlad, blankkontroll). En maximal läckagekontroll bör också ingå i varje körning för att möjliggöra beräkning av FL₂₀-värdena. Maximalt läckage fastställs genom användning av en kontrollinsats utan celler.

Bestämning av fluoresceinets permeabilitet

Omedelbart efter avlägsnandet av test- och kontrollkemikalierna tillsätts 400 µl av 0,1 mg/ml natriumfluoresceinlösning (0,01 % (w/v) kalciumhaltig HBBS [vid en koncentration på 1,0–1,8 mM] utan fenolrött) till insatserna (t.ex. Millicell-HA). Dessa odlingar förvaras i 30 minuter vid rumstemperatur. I slutet av inkubationsperioden med fluorescein avlägsnas insatserna försiktigt från varje hål. En visuell kontroll görs av varje filter och eventuella skador som kan ha uppstått under hanteringen registreras.

Den mängd fluorescein som har läckt genom monolagret och insatsen kvantifieras i den lösning som fanns kvar i hålen efter avlägsnandet av insatserna. Mätningarna görs i en spektrofluorometer vid excitations- och sändningsvåglängder på 485 nm respektive 530 nm. Spektrofluorometerns känslighet bör ställas in för högsta numeriska skillnad mellan maximal FL (insats utan celler) och minimal FL (insats med konfluent monolager behandlat med negativ kontroll). På grund av skillnaderna hos den använda spektrofluorometern bör man tillämpa en känslighetsgrad som ger en fluorescensintensitet > 4 000 vid den högsta fluoresceinläckagekontrollen. Det maximala FL-värdet bör inte vara större än 9 999. Maximal fluorescensintensitet för läckage bör hålla sig inom det linjära intervallet för den använda spektrofluorometern.

Tolkning av resultaten och förutsägbarhetsmodell

Mängden FL är proportionerlig till den kemiskt inducerade skadan på de täta fogarna. Procentandelen FL för varje testad koncentration av kemikalier beräknas från de FL-värden som erhållits för testkemikalien med hänvisning till FL-värdena från den negativa kontrollen (avläsning från det konfluenta cellmonolager som behandlats med negativ kontroll) och den maximala läckagekontrollen (avläsning av mängden FL genom en insats utan celler).

Medelvärde för maximal läckagefluorescensintensitet = x

Medelvärde för 0 % läckagefluorescensintensitet (NC) = y

Medelvärdet för 100 % läckage erhålls genom att medelvärdet för 0 % läckage subtraheras från medelvärdet för maximalt läckage.

dvs. $x - y = z$

Procentandelen läckage för varje fast dos erhålls genom att 0 % läckage subtraheras från medelvärdet för fluorescensintensitet i de tre replikativläsningarna (m). Detta värde divideras sedan med 100 % läckage, dvs. % FL = [(m-y) / z] × 100 %, där

m = medelvärde för fluorescensintensitet i de tre replikativmätningarna för den berörda koncentrationen

% FL = procentandel fluorescein som läcker igenom cellagret

Följande ekvation bör tillämpas för beräkningen av den kemiska koncentration som orsakar 20 % FL:

$$FL_D = [(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

där

D = % hämning

A = % skada (20 % fluoresceinläckage)

B = % fluoresceinläckage < A

C = % fluoresceinläckage > A

M_C = koncentration (mg/ml) av C

M_B = koncentration (mg/ml) of B

Gränsvärdet för FL₂₀ för förutsägelser om huruvida kemikalier är frätande/kraftigt irriterande för ögonen anges nedan:

FL ₂₀ (mg/ml)	FN GHS K&M	EU CLP K&M	U.S. EPA C&L
≤ 100	Kategori 1	Kategori 1	Kategori I

K&M: klassificering och märkning

FL-testmetoden rekommenderas endast för identifiering av vattenlösliga kemikalier som är frätande och kraftigt irriterande för ögonen (GHS-kategori 1, CLP-kategori 1, EPA-kategori I) (se punkterna 1 och 10).

För att identifiera vattenlösliga kemikalier (ämnen och blandningar) (3) (6) (7) som kemikalier som "inducerar allvarlig ögonskada" (GHS-/CLP-kategori 1) eller som frätande eller kraftigt irriterande för ögonen EPA-kategori I) ska testkemikalien inducera ett FL₂₀-värde på ≤ 100 mg/ml.

Godkännande av resultat

Medelvärdet för maximalt fluoresceinläckage (x) ska vara högre än 4 000 (se punkt 31), medelvärdet för 0 % läckage (y) ska vara lika med eller lägre än 300, och medelvärdet för 100 % läckage (z) ska hålla sig mellan 3 700 och 6 000.

Testet anses godtagbart om den positiva kontrollen producerade 20–40 % skada på cellagret (mätt som % fluoresceinläckage).

DATA OCH RAPPORTERING

Data

För varje omgång ska data från enskilda replikathåll (t.ex. värden för fluorescensintensitet och beräknade FL-procentandelar för varje testkemikalie, inklusive klassificering) rapporteras i tabellform. Dessutom ska medelvärden ± SD för individuella replikativmätningar i varje körning redovisas.

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande information:

Test- och kontrollkemikalier.

- Kemisk beteckning såsom den strukturella beteckning som används i Chemical Abstracts Service (CAS) och eventuella andra kända beteckningar
- Kemikalies CAS-nummer, om det är känt.
- Ämnets eller blandningens renhet och sammansättning (viktprocent) i den mån uppgifterna finns att tillgå.
- Fysikaliska/kemiska egenskaper som är relevanta för utförandet av undersökningen (t.ex. fysiskt tillstånd, flyktighet, pH-värde, stabilitet, vattenlöslighet och kemisk klass).
- Behandling av test-/kontrollkemikalier före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).
- Lagringsförhållanden.

Motivering för den testmetod och det protokoll som använts

- Bör inbegripa överväganden när det gäller tillämpningsområde samt testmetodens begränsningar.

Testbetingelser

- Beskrivning av använt cellsystem, inklusive äkthetsintyg samt mykoplasmastatus för cellinjen.
- Detaljerade uppgifter om försöksförfarandet.
- Testkemikaliekoncentration(er).
- Exponeringstiden för testkemikalien.
- Inkubationstid med fluorescein.
- Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet.
- Beskrivning av utvärderingskriterierna.
- Hänvisningar till modellens historiska data (t.ex. negativa och positiva kontroller, referenskemikalier, i förekommande fall).
- Information om den tekniska kompetens som påvisats av laboratoriet.

Resultat

- Uppställning i tabellform av data från individuella testkemikalier och kontroller för varje körning och varje replikatmätning (inklusive individuella resultat, medelvärden och SD).
- Härledda klassificeringar med hänvisning till prediktionsmodell och/eller beslutskriterier.
- Beskrivning av övriga observerade effekter.

Diskussion av resultaten.

- Bör inbegripa överväganden av tvetydiga resultat (punkt 35: FL₂₀ > 100 mg/ml) och ytterligare tester.

Slutsatser

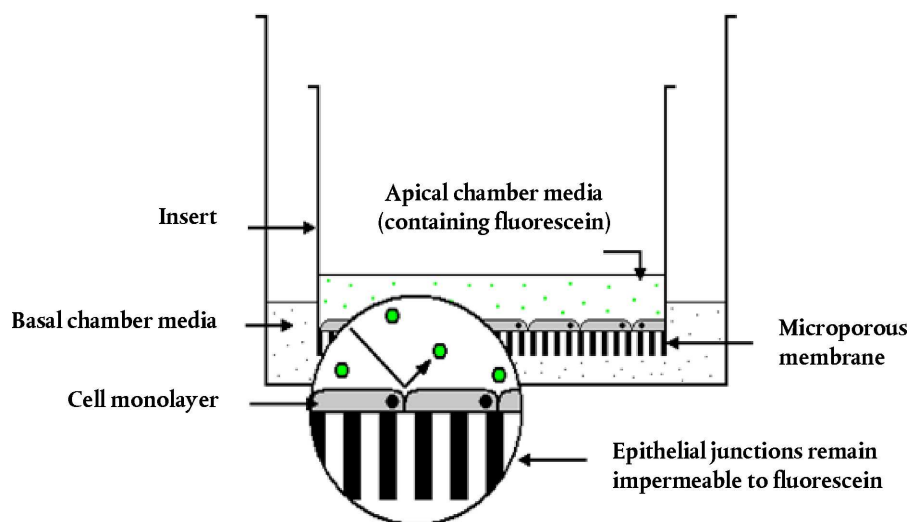
LITTERATUR

- (1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, New York och Genève: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Finns 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. m.fl. (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 denna bilaga, *Akut ögonirritation/korrosion*.
 - (6) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italien: Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (Ecvam). Finns på [<http://ecvam-dbal.m.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.
-

Tillägg 1

DIAGRAM ÖVER MDCK-CELLER OM ODLATS PÅ ETT INSATSMEMBRAN FÖR FL-TESTMETODEN

Ett konfluent lager av MDCK-celler odlas på semipermeabla membran i en insats. Insatserna placeras i hålen på 24-hålsplattor.



Figuren hämtad från: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, Storbritannien.

Tillägg 2

DEFINITIONER

Noggrannhet: Ett mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Den är ett mått på testmetodens prestanda och relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med "konkordans" för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (38).

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

EPA-kategori I: Kemikalier som framkallar frätande (irreversibel skada på okulär vävnad) eller korneal påverkan eller irritation som varar mer än 21 dagar (2).

CLP-förordningen (förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar): Genom denna förordning genomförs i Europeiska unionen (EU) FN:s GHS-system för klassificering av kemikalier (ämnen och blandningar).

Falskt negativt värde: den andel av alla positiva ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som negativ. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

Falskt positivt värde: den andel av alla negativa (icke-aktiva) ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som positiva. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

FL₂₀: kan uppskattas genom bestämning av den koncentration vid vilken den testade kemikalien orsakar 20 % fluoresceinläckage genom cellagret.

Fluoresceinläckage: den mängd fluorescein som passerar genom cellagret, mätt med spektrofluorometri.

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

GHS-kategori 1: vävnadsskada i ögat eller kraftig synnedbättring som uppstår efter applicering av en testkemikalie på ögats främre yta och som inte är fullt reversibel inom 21 dagar från appliceringen (2).

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

Blandning används i FN: s GHS-klassificering; en blandning eller en lösning som består av två eller flera ämnen i vilka de inte reagerar.

Negativ kontroll: ett obehandlat replikat som innehåller alla komponenter i ett testsystem. Detta prov hanteras tillsammans med testkemikaliebehandlade prover och andra kontrollprover för att avgöra huruvida lösningsmedlet påverkar testsystemet.

Icke-klassificerad: kemikalier som inte är klassificerade enligt GHS-kategori 1, 2A eller 2B, CLP-kategori 1 eller 2 eller EPA-kategorierna I, II eller III, ögonirriterande ämnen.

Ämne som är frätande för ögonen: a) kemikalier som orsakar irreversibel vävnadsskada på ögat, b) kemikalier som klassificeras som ögonirriterande enligt GHS-kategori 1, CLP-kategori 1 eller EPA-kategori I.

Ögonirriterande ämne: a) kemikalier som orsakar en reversibel ändring i ögat efter applicering på ögats främre yta, b) kemikalier som klassificeras som ögonirriterande enligt GHS-kategorierna 2A eller 2B, CLP-kategori 2 eller EPA-kategorierna II eller III.

Kraftigt ögonirriterande ämne: a) kemikalier som orsakar vävnadsskada i ögat efter applicering på ögats främre yta som inte läker inom 21 dagar från appliceringen eller orsakar allvarlig synnedsättning, b) kemikalier som klassificeras som ögonirriterande enligt GHS-kategori 1, CLP-kategori 1 eller EPA-kategori I.

Positiv kontroll: ett replikat som innehåller testsystemets alla komponenter och behandlas med en kemikalie som veterligen inducerar positiv respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsens variationer kan bedömas över tiden, bör den positiva respons som framkallas inte vara för extrem.

Kvalifikationskemikalier: En deluppsättning av förteckningen över referenskemikalier som kan användas av ett nytt laboratorium för att visa att det är kvalificerat för att tillämpa den validerade referenstestmetoden.

Relevans: beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida detta förhållande är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl man genom testet korrekt kan mäta och förutse den biologiska effekt det gäller. Relevans omfattar också överväganden om en testmetods noggrannhet (konkordans) (8).

Tillförlitlighet: mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när den utförs med hjälp av samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier och repeterbarheten inom laboratorier.

Ersättningstest: ett test som är utformat att ersätta ett test som används rutinmässigt och som är godkänt för faroidentifiering och/eller riskbedömning och som har konstaterats ge motsvarande eller bättre skydd av människors eller djurs hälsa eller miljön, enligt det som är tillämpligt, jämfört med det godkända testet, för alla tänkbara testningssituationer och kemikalier.

Känslighet: den andel av alla positiva/aktiva kemikalier som klassificeras korrekt i testet. Det är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (8).

Allvarliga ögonskador: vävnadsskador som uppstår i ögat, eller allvarlig fysisk synnedsättning, efter applicering av en testkemikalie på ögats främre yta, och som inte är fullt reversibla inom 21 dagar från appliceringen.

Lösningsmedels-/vehikelkontroll: ett obehandlat prov som innehåller testsystemets alla komponenter, inbegripet lösningsmedlet eller vehikeln som behandlas tillsammans med testkemikaliebehandlade och andra kontrollprover i syfte att fastställa bakgrundsrespons för de prover som behandlas med testkemikalien upplöst i samma lösningsmedel eller vehikel. När detta prov testas med en parallell negativ kontroll, visar provet också huruvida lösningsmedlet eller vehikeln påverkar testsystemet.

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

Ämne: Används inom ramen för GHS för att beteckna kemiska grundämnen och deras föreningar i naturlig eller framställd form, inklusive eventuella tillsatser nödvändiga för att bevara produktens stabilitet och sådana föroreningar som härrör från framställningsprocessen, men exklusive eventuella lösningsmedel som kan avskiljas utan att det påverkar ämnets stabilitet eller ändrar dess sammansättning,

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

Stegvis testningsstrategi: en strategi för stegvis testning där all befintlig information om en testkemikalie granskas i en angiven ordning, med användning av förfarandet med sammanvägd bedömning (weight of evidence) för att avgöra om det finns tillräckligt med information till hands för att besluta om faroklassificering innan man går vidare till nästa steg. Om testkemikaliens förmåga att framkalla irritation kan fastställas på grundval av befintlig information behövs ingen ytterligare testning. Om testkemikaliens förmåga att framkalla irritation inte kan fastställas på grundval av befintlig information genomförs ett stegvis sekventiellt djurförsöksförfarande tills att det går att fastställa en otvetydig klassificering.

Validerad testmetod: en testmetod för vilken valideringsstudier har genomförts för att fastställa relevans (inbegripet noggrannhet) och tillförlitlighet för ett specifikt ändamål. Det är viktigt att notera att en validerad testmetod kanske inte är tillräckligt exakt och tillförlitlig när det gäller ett visst föreslaget ändamål (8).

Sammanvägd bedömning: (weight of evidence) ett förfarande där man bedömer styrkor och svagheter hos flera uppgifter för att nå fram till och motivera en slutsats rörande en kemikalies faropotential.

Tillägg 3

KVALIFIKATIONSÄMNEN FÖR FL-TESTMETODEN

Före rutinanvändning av en testmetod bör laboratoriet påvisa den tekniska kvaliteten genom att korrekt identifiera klassificeringen av frätande verkan på ögonen för de åtta kemikalier som rekommenderas i tabell 1. Dessa kemikalier har valts ut att representera responsskalan för kemikalier som är lokalt frätande/irriterande för ögonen enligt resultaten från in vivo-test på kaninögon (TG 405, TM B.5(5)) (dvs. kategorierna 1, 2A, 2B eller Ingen klassificering enligt GHS). När det gäller FL-testets validerade användningsområde (dvs. endast att identifiera kemikalier som är frätande/kraftigt irriterande för ögonen) finns det dock bara två testutfall för klassificeringsändamål (frätande/kraftigt irriterande eller icke-frätande/ej kraftigt irriterande) som laboratoriet kan använda för att visa att det är kvalificerat. Till övriga kriterier hör att ämnena ska vara kommersiellt tillgängliga, att det finns tillgång till in vivo-referensdata av hög kvalitet och att det finns data av hög kvalitet från FL-testmetoden. Av detta skäl valdes kvalifikationskemikalierna från dokumentet *Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing* (8), som användes för den retrospektiva valideringen av FL-testmetoden.

Tabell 1

Rekommenderade ämnen för att påvisa teknisk kvalitet med FL-testmetoden

Kemikalie	CAS-nummer	Kemisk klass ⁽¹⁾	Fysikalisk form	In vivo-klassificering ⁽²⁾	In vitro-klassificering ⁽³⁾
Bensalkoniumklorid (5 %)	8001-54-5	Oniumförening	Vätska	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
Prometazinhydroklorid	58-33-3	Amin/amidin, heterocyklisk organisk sulfatförening	Fast ämne	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
Natriumhydroxid (10 %)	1310-73-2	Alkali	Vätska	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
Natriumlaurylsulfat (15 %)	151-21-3	Karboxylsyra (salt)	Vätska	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
4-karboxybensaldehyd	619-66-9	Karboxylsyra, aldehyd	Fast ämne	Kategori 2 A	Icke-frätande/Icke kraftigt irriterande
Ammoniumnitrat	6484-52-2	Oorganiskt salt	Fast ämne	Kategori 2 A	Icke-frätande/Icke kraftigt irriterande
Etyl-2-metylacetat	609-14-3	Keton, ester	Vätska	Kategori 2 B	Icke-frätande/Icke kraftigt irriterande
Glycerol	56-81-5	Alkohol	Vätska	Ingen klassificering	Icke-frätande/Icke kraftigt irriterande

Förkortningar: CAS-nr: nummer i registret för Chemical Abstracts Service.

⁽¹⁾ Varje testkemikalie tilldelades en kemisk klass med användning av ett standardsystem baserat på klassificeringssystemet National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (finns på <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ Baserat på resultat från in vivo-test på kaninögon (OECD TG 405, TM B.5) och med användning av GHS och CLP.

⁽³⁾ Baserat på resultat som erhållits med FL (INVITTOX-protokoll nr 71 (6)).

B.62 Alkaline comet assay in vivo på däggdjur

INLEDNING

Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 489 (2016). Alkaline comet assay in vivo (gelelektrofores av enskilda celler) (nedan kallad *kometmetoden*) används för att detektera brott på DNA-strängar i celler eller kärnor som isolerats från flera vävnader från djur, vanligen gnagare, som har exponerats för potentiellt gentoxiska material. Kometmetoden har granskats och rekommendationer har publicerats av flera expertgrupper (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). Denna testmetod är en del av en serie av testmetoder för genetisk toxikologi. Ett OECD-dokument som ger kortfattad information om tester inom genetisk toxikologi och en översikt över de senaste ändringarna av dessa testriktlinjer har utarbetats (11).

Syftet med kometmetoden är att identifiera kemikalier som orsakar DNA-skador. Under alkaliska betingelser (> pH 13 kan kometmetoden detektera enkla och dubbla strängbrott, t.ex. till följd av samverkan med DNA, alkali-labila ställen eller obeständiga brott på DNA-strängar till följd av DNA-excisionsreparering. Dessa strängar kan repareras och kan leda till en ej beständig effekt, kan vara dödliga för cellen eller kan fixeras i en mutation som leder till en permanent viabel ändring. De kan också leda till kromosomskador, som även förknippas med många sjukdomar hos människan, inklusive cancer.

Ett formellt valideringsförsök av kometmetoden genomfördes 2006–2012, samordnat av det japanska centret för validering av alternativa metoder (JaCVAM) tillsammans med Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (ECVAM) och amerikanska ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*) samt NICEATM (*TP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods*) (12). Denna testmetod inbegriper rekommenderad användning av och begränsningar hos kometmetoden och baseras på det slutliga protokoll (12) som användes i valideringsförsöket samt på ytterligare relevanta publicerade och opublicerade data (skyddade laboratedata).

Definitioner av centrala begrepp anges i tillägg 1. Det bör noteras att många analysplattformar kan användas för detta försök (objektglas, gellickar, 96-hålsplattor osv.). För enkelhetens skull används termen "analysplattform" i resten av detta dokument.

INLEDANDE ÖVERVÅGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

Kometmetoden är en metod för mätning av brott på DNA-strängar i eukaryota celler. Enskilda celler/kärnor inbäddade i agaros på en analysplattform lyseras med detergent och hög saltkoncentration. Detta lyseringssteg bryter ned cell- och kärnmembranen och möjliggör frisläppande av tvinnade DNA-slingor, som vanligen kallas nukleoider, och DNA-fragment. Elektrofores vid högt pH ger upphov till strukturer som liknar kometer, och dessa kan efter tillsats av lämpliga fluorescerande färgämnen observeras med hjälp av fluorescensmikroskopi. DNA-fragmenten migrerar bort från "komethuvudet" till "kometssvansen" baserat på storlek och kometsvansens intensitet i förhållande till den totala intensiteten (huvud plus svans) avspeglar graden av DNA-brott (13) (14) (15).

Kometmetoden är särskilt relevant för att bedöma gentoxiska risker, eftersom försöksresponsen är beroende av in vivo ADME (absorption, distribution, metabolism och exkretion) och även av DNA-reparationsprocesserna. Dessa kan variera mellan arter, vävnader och typer av DNA-skador.

För att uppfylla djurskyddskraven, särskilt minskad användning av försöksdjur (3R-principen – ersättning, begränsning och förfining), kan detta försök även integreras med andra toxikologiska studier, t.ex. upprepade dostoxicitetsundersökningar (10) (16) (17). Ett annat alternativ är att kombinera endpointen med andra endpoints för gentoxicitet, t.ex. mikrokärntestet av erythrocyter hos däggdjur (18) (19) (20). Kometmetoden utförs oftast på gnagare, även om det har tillämpats på andra däggdjurs- och icke-däggdjursarter. Användning av andra arter än gnagare bör motiveras etiskt och vetenskapligt från fall till fall och det rekommenderas starkt att kometmetoden endast utförs på andra arter än gnagare som en del av en annan toxicitetsstudie, inte som ett fristående test.

Valet av exponeringsväg och de vävnader som ska undersökas bör grundas på all tillgänglig/befintlig kunskap om testkemikalierna, t.ex. avsedd/förväntad exponeringsväg för människor, metabolism och distribution, potential för kontaktpunkteffekter, strukturella varningssignaler, andra data om gentoxicitet eller toxicitet samt undersökningens syfte. I förekommande fall kan därför testkemikaliernas gentoxiska potential undersökas i målvävnader för cancerogena och/eller andra toxiska effekter. Försöket anses även vara användbart för fortsatta undersökningar av gentoxicitet, med detektion i ett in vitro-system. Det är lämpligt att använda kometmetoden på en vävnad av intresse när det rimligen kan förväntas att vävnaden kommer att exponeras på lämpligt sätt.

De mest omfattande valideringarna av försöket har gjorts av somatiska vävnader hos hanrättor i samarbetsstudier såsom JaCVAM-testet (12) och i Rothfuss m.fl., 2010 (10). I JaCVAM:s internationella valideringsförsök används lever och magsäck. Levern är lämplig eftersom den är det mest aktiva organet i kemikaliers metabolism och ofta ett målorgan för cancerogenitet. Magsäcken är lämplig eftersom den vanligen är det första organ som kemikalier kommer i kontakt med efter oral exponering, även om andra delar av matsmältningsorganet såsom tolvfingertarmen och tomtarmen bör övervägas som kontaktpunktsvävnader. De kan dessutom vara mer relevanta för människor än gnagares glandulära magsäck. Det är viktigt att se till att sådana vävnader inte exponeras för alltför höga koncentrationer av testkemikalien (21). Tekniken är i princip tillämplig på alla vävnader från vilka analyserbara enstaka cell-/kärnsuspensioner kan härledas. Skyddade data från flera laboratorier visar att tekniken har tillämpats med framgång på många olika vävnader. Det finns även många publikationer som visar att den är tillämplig på andra organ eller vävnader än lever och magsäck, t.ex. tomtarm (22), njure (23) (24), hud (25) (26) eller urinblåsa (27) (28), lunga och celler från bronkoalveolärt lavage (BAL) (relevant för undersökningar av kemikalier som inandas) (29) (30). Tester har också utförts på flera organ (31) (32).

Gentoxiska effekter på könsceller kan vara av intresse, men det bör noteras att standardvarianten av kometmetoden såsom den beskrivs i denna testmetod inte anses lämplig för att mäta brott på DNA-strängar i mogna könsceller. Eftersom höga och variabla bakgrundsnivåer hos DNA-skador har rapporterats i litteraturgranskningar om användningen av kometmetoden för gentoxicitet hos könsceller (33), krävs protokolländringar och förbättrade standardiserings- och valideringsstudier innan kometmetoden för mogna könsceller (t.ex. spermier) kan inbegripas i denna testmetod. Det rekommenderade exponeringssystem som beskrivs i denna testmetod är inte optimalt, och det krävs längre exponerings- eller provtagningstider för en meningsfull analys av brott på DNA-strängar hos mogna spermier. Gentoxiska effekter som uppmäts med kometmetoden i testikelceller på olika differentieringsstadier har beskrivits i litteraturen (34) (35). Det bör dock noteras att könskörtlar innehåller en blandning av somatiska celler och könsceller. Därför avspeglar positiva resultat i hela könskörtlar (testis) inte nödvändigtvis skada på könsceller. De visar dock att de testade kemikalierna och/eller dess metaboliter har nått könskörteln.

Tvärbindingar kan inte detekteras på ett tillförlitligt sätt med standardförsöksbetingelserna för kometmetoden. Under vissa modifierade försöksbetingelser är det möjligt att detektera DNA-DNA- och DNA-proteintvärbindingar och andra basmodifikationer, såsom oxiderade baser (23) (36) (37) (38) (39). Det krävs dock ytterligare arbete för att karakterisera dessa nödvändiga protokollmodifieringar på lämpligt sätt. Detektering av tvärbindande agens är således inte det främsta syftet med försöket såsom det beskrivs här. Försöket är inte lämpligt för detektion av aneugener, inte ens med modifieringar.

På grund av nuvarande kunskapsstatus har kometmetoden flera andra begränsningar (se tillägg 3). Testmetoden förväntas granskas i framtiden och om nödvändigt revideras mot bakgrund av den erfarenhet som vunnits.

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

TESTMETODENS PRINCIP

Försöksdjuren exponeras för testkemikalien på ett lämpligt sätt. En detaljerad beskrivning av dosering och provtagning ges i punkterna 36–40. Vävnaderna av intresse dissekeras vid de valda provtagningstidpunkterna och suspensioner av enstaka celler/kärnor bereds (perfusion in situ kan utföras om det anses användbart, t.ex. för lever) och bäddas in i mjukt agar så att de immobiliseras på analysplattformar. Cellerna/kärnorna behandlas med lyseringsbuffert för att avlägsna cell- och/eller kärnmembran och exponeras för stark alkali, t.ex. $\text{pH} \geq 13$, så att DNA:t löser upp sig och lossade DNA-slingor och fragment frigörs. Kärn-DNA i agar genomgår därefter elektrofores. Normala icke-framgraderade DNA-molekyler förblir i den position där kärn-DNA fanns i agar, medan eventuellt fragmenterat DNA och lossade DNA-slingor migrerar mot anoden. Efter elektrofores visualiseras DNA genom lämplig fluorescerande färg. Beredningarna bör analyseras med mikroskop och hel- eller halvautomatiska bildanalysystem. Den mängd DNA som har migrerat under elektrofores och migrationsavståndet avspeglar DNA-fragmentens mängd och storlek. Det finns flera endpoints för kometmetoden. DNA-innehållet i kometsvansen (% DNA i kometsvans eller % intensitet i kometsvans) har rekommenderats för bedömningen av DNA-skador (12) (40) (41) (42). Efter analys av ett tillräckligt antal kärnor analyseras data med lämpliga metoder för att bedöma försöksresultaten.

Det bör noteras att ändringar av olika aspekter av metoden, bland annat provberedning, elektroforesbetingelser, visuella analysparametrar (t.ex. färgintensitet, mikroskopljusets intensitet och användning av mikroskopfilter samt kameradynamik) och omgivningsförhållanden (t.ex. bakgrundsbelysning) har undersökts och kan påverka DNA-migrationen (43) (44) (45) (46).

KVALIFIKATIONSPRÖVNING AV LABORATORIET

Laboratorierna bör fastställa att de är kvalificerade för att utföra kometmetoden genom att visa sin förmåga att erhålla suspensioner med enstaka celler eller kärnor av tillräcklig kvalitet för varje målvävnad och varje använd art. Beredningarnas kvalitet utvärderas först av procentandelen DNA i kometsvans för vehikelbehandlade djur som håller sig inom ett reproducerbart lågt intervall. Aktuella data tyder på att gruppens medelvärde för procentandelen DNA i kometsvans (*group mean % tail DNA* – baserat på genomsnittet av medianvärdena, se punkt 57 för närmare uppgifter om dessa termer) hos råttlever bör helst inte överstiga 6 %, vilket överensstämmer med värdena i JaCVAM:s valideringsförsök (12) och i andra publicerade och skyddade data. För närvarande finns inte tillräckliga data för rekommendationer om optimala eller godtagbara intervall för andra vävnader. Detta utesluter inte användningen av andra vävnader om det är motiverat. Testrapporten bör innehålla en lämplig granskning av resultaten av kometmetoden för dessa vävnader jämfört med publicerad litteratur eller skyddade data. För det första är en låg procentandel DNA i kometsvans önskvärd i syfte att skapa ett tillräckligt dynamiskt intervall för att det ska vara möjligt att detektera en positiv effekt. För det andra ska varje laboratorium kunna reproducera förväntad respons för direkta mutagener och promutagener med olika verkningmekanismer enligt tabell 1 (punkt 29).

Positiva ämnen kan väljas om så är lämpligt, t.ex. från JaCVAM:s valideringsförsök (12) eller från andra publicerade data (se punkt 9). Valen ska motiveras och en tydligt positiv respons i vävnaden ska visas. Förmåga att detektera svaga effekter av kända mutagener som EMS vid låga doser ska också visas, t.ex. genom att fastställa dos-responsförhållanden med lämpliga antal doser i lämpliga intervaller. Laboratorierna bör främst inrikta sig på att visa att de är kvalificerade för de oftast använda vävnaderna, t.ex. lever från gnagare, där det är möjligt att jämföra befintliga data och förväntade resultat (12). Data för andra vävnader, t.ex. magsäck/tolvfingertarm/tomtarm, blod osv. kan samlas in samtidigt. Laboratoriet måste visa att det är kvalificerat för varje individuell vävnad hos varje art som det planerar att undersöka. Det måste också visa att en godtagbar positiv respons med en känd mutagen (t.ex. EMS) kan erhållas för den vävnaden.

Data om vehikel-/negativ kontroll bör samlas in för att påvisa att data om negativ respons kan reproduceras och för att säkerställa att försökets tekniska aspekter har kontrollerats på lämpligt sätt eller påvisa behovet av en omvärdering av de historiska kontrollintervallen (se punkt 22).

Laboratoriet kan samla in olika vävnader vid obduktion och behandla dem för komet-analys, men det måste vara kvalificerat för att skörda flera vävnader från ett enda djur för att säkerställa att eventuella DNA-skador inte förloras och att komet-analysen inte äventyras. Tidsperioden från avlivning till avlägsnande av vävnader för behandling kan vara kritisk (se punkt 44).

Djurskyddsaspekter måste beaktas vid kvalifikation för detta test, och därför kan vävnader från djur som använts i andra test även användas vid kompetensutvecklingen för testets olika aspekter. Dessutom är det kanske inte nödvändigt att utföra en fullständig undersökning när en ny testmetod etableras i laboratoriet, och färre djur eller testkoncentrationer kan användas vid utvecklingen av den nödvändiga kompetensen.

Historiska kontrolldata

Under kvalifikationsundersökningarna bör laboratoriet bygga upp en historisk databas för att fastställa positiva och negativa kontrollintervall och fördelningar för relevanta vävnader och arter. Rekommendationer om hur man bygger upp och använder historiska kontrolldatabaser (t.ex. kriterier för att innefatta och utesluta data samt acceptanskriterier för ett givet försök) finns i litteraturen (47). Olika vävnader och arter och olika vehiklar och administrationsvägar kan ge olika negativa kontrollvärden för procentandelen DNA i kometsvans. Det är därför viktigt att fastställa negativa kontrollintervall för varje vävnad och art. Laboratorierna bör använda kvalitetskontrollmetoder såsom kontrolldiagram (t.ex. C-diagram eller X-stapelldiagram (48)), för att fastställa hur variabla deras data är och för att visa att metoden är "under kontroll". Valet av lämpliga positiva kontrollämnen, dosintervall och försöksbetingelser (t.ex. elektroforesbetingelser) kan även behöva optimeras för att detektera svaga effekter (se punkt 17).

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

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Förberedelser

Val av djurart

I regel används vanliga laboriestammar av friska unga vuxna gnagare (6–10 veckor gamla vid behandlingsstarten, även om något äldre djur också är godtagbara). Valet av gnagarart bör baseras på i) arter som använts i andra toxicitetsundersökningar (för att möjliggöra korrelering av data och integrerade undersökningar), ii) arter som har utvecklat tumörer i en cancerogenitetsstudie (vid undersökningar av carcinogenesmekanismer), eller iii) arter med metabolism som är mest relevanta för människor, om det är känt. Råttor används rutinmässigt i detta test. Andra arter kan dock användas om det är etiskt och vetenskapligt motiverat.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

För gnagare är den ideala temperaturen i försöksdjurens rum 22°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$). Den relativa fuktigheten bör helst vara 50–60 %, men minst 30 % och bör helst inte överstiga 70 % utom när rummet rengörs. Artificiell belysning bör användas, med en dygnsrytm på 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodring kan konventionellt laboratoriefoder användas med obegränsad tillgång till dricksvatten. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie när den administreras genom denna väg. Gnagarna bör hållas i små grupper (vanligen högst fem) av samma kön, om inget aggressivt beteende kan förväntas. Djuren får endast hållas individuellt om det är vetenskapligt motiverat. Fasta golv bör användas när det är möjligt eftersom nätgolv kan orsaka allvarlig skada (49). Lämplig miljöberikning krävs.

Förberedelse av djuren

Djuren fördelas slumpvis i kontroll- och behandlingsgrupper. Djuren identifieras individuellt och acklimatiseras till laboratoriemiljö under minst fem dagar före behandlingsstart. Den minst invasiva metoden för unik identifiering av djur måste användas. Lämpliga metoder är ringmärkning, taggar, mikrochip och biometrisk identifiering. Tå- och öronklippning är inte vetenskapligt motiverat i dessa tester. Burarna bör ordnas så att eventuella effekter på grund av deras placering minimeras. När undersökningen ska påbörjas är det lämpligt att viktskillnaden mellan djuren är så liten som möjligt och den bör inte överstiga $\pm 20\%$.

Beredning av doser

Fasta testkemikalier bör lösas upp i, eller blandas med, lämpliga vehiklar eller blandas i foder eller dricksvatten innan dosen administreras till djuren. Testkemikalier i flytande form kan doseras direkt eller spädas ut före doseringen. Vid inhalationsexponering kan testkemikalier administreras såsom gas, ånga eller en fast/flytande aerosol, beroende på deras fysikalisk-kemiska egenskaper (50) (51).

Nygjorda beredningar av testkemikalien bör användas om inte stabilitetsdata visar att lagringen är acceptabel och lämpliga lagringsförhållanden bör fastställas.

Testbetingelser

Vehikel

Vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testkemikalierna. Om andra vehiklar än väl kända används bör det finnas data som visar att de är kompatibla när det gäller testdjur, administrerings sätt och endpoint. När det är möjligt, rekommenderas att man i första hand överväger vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar. Det bör noteras att vissa vehiklar (särskilt viskösa vehiklar) kan inducera inflammation och öka bakgrundnivåerna för brott på DNA-strängar vid kontaktpunkten, särskilt vid flera administreringar.

Kontroller

Positiva kontroller

Vid denna tidpunkt inkluderas vanligen en grupp på minst tre analyserbara djur av samma kön eller i förekommande fall av båda könen (se punkt 32), som behandlas med ett positivt kontrollämne. I framtiden kan det bli möjligt att påvisa lämplig kvalifikation för att minska behovet av positiva kontroller. Om provtagningarna sker vid flera tillfällen (t.ex. med ett enda administreringsprotokoll) behöver man bara inkludera positiva kontroller vid ett av provtagningstillfällena, men det är viktigt att säkerställa en lämplig balans i försöket (se punkt 48). Det är inte nödvändigt att administrera parallella positiva kontrollämnen på samma sätt som testkemikalien, även om det är viktigt att samma administrerings sätt används vid mätningen av kontaktpunkteffekter. Man ska visa att de positiva kontrollämnena inducerar brott på DNA-strängar i alla vävnader för testkemikalien i fråga. EMS är sannolikt den lämpligaste positiva kontrollen, eftersom den har producerat brott på DNA-strängar i alla undersökta vävnader. Doserna av positiva kontrollämnena ska väljas så att de producerar måttliga effekter som möjliggör en kritisk bedömning av försökets prestanda och sensitivitet. De kan baseras på dos-responskurvor som etablerats av laboratoriet när det kvalificerade sig för testet. Procentandelen DNA i kometsvans hos de parallella positiva kontrolldjuren bör överensstämma med laboratoriets på förhand fastställda intervall för varje enskild vävnad och provtagningstid för arten (se punkt 16). Exempel på positiva kontrollämnena och vissa av deras målvävnader (gnagare) finns i tabell 1. Andra ämnen än de som anges i tabell 1 kan väljas om det är vetenskapligt motiverat.

Tabell 1

Exempel på positiva kontrollämnen och vissa av deras målvävnader

Ämnen och CAS-RN-nummer
Etylmetansulfonat (CAS RN 62-50-0) för alla vävnader
Etylnitrosoarea (CAS RN 759-73-9) för lever och magsäck, tolvfingertarm eller tomtarm
Metylmetansulfonat (CAS RN 66-27-3) för lever och magsäck, tolvfingertarm eller tomtarm, lunga och celler från bronkoalveolärt lavage (BAL), njure, urinblåsa, lunga, testis och benmärg/blod
N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (CAS RN: 70-25-7) för magsäck, tolvfingertarm eller tomtarm
1,2-dimetylhydrazin 2HCl (CAS RN 306-37-6) för lever och inälvor
N-metyl-N-nitrosoarea (CAS RN 684-93-5) för lever, benmärg, blod, njure, magsäck, tomtarm och hjärna.

Negativa kontroller

En grupp av negativa kontroldjur, behandlade med endast vehikel, och i övrigt behandlade på samma sätt som behandlingsgrupperna, bör inkluderas för varje test för varje provtagningstillfälle och vävnad. Procentandelen DNA i kometsvans hos de parallella negativa kontroldjuren bör hålla sig inom laboratoriets på förhand fastställda bakgrundsintervall för varje enskild vävnad och provtagningstid för arten (se punkt 16). I avsaknad av historiska eller publicerade kontroldata som visar att inga skadliga eller gentoxiska effekter induceras av den valda vehikeln, antalet administreringar eller administreringsvägar, bör preliminära undersökningar göras innan den fullständiga undersökningen genomförs, i syfte att fastställa att vehikelkontrollen är godtagbar.

FÖRFARANDE

Djurens antal och kön

Det finns få data om hondjur som möjliggör en jämförelse mellan könen i samband med kometmetoden. Dock är andra gentoxiska responser in vivo vanligen liknande mellan han- och hondjur, och därför kan de flesta undersökningar utföras på båda könen. Om det finns data som visar på relevanta skillnader mellan hanar och honor (t.ex. skillnader i systemisk toxicitet, metabolism, biotillgänglighet osv., inklusive ett preliminärt test) bör båda könen användas. I detta fall kan det vara lämpligt att göra en undersökning av båda könen, t.ex. som en del av en upprepade dosotoxicitetsundersökning. Om båda könen används kan ett faktorförsök vara lämpligt. En närmare beskrivning av hur man analyserar data med användning av faktorförsök ges i tillägg 2.

Gruppernas storlek vid försöksstarten (och under kvalificeringen) bör fastställas. Målet bör vara minst fem analyserbara djur av ett kön, eller av varje kön om båda könen används, per grupp (färre i den parallella positiva kontrollgruppen, se punkt 29). I de fall där exponering av människa för kemikalier kan ge könsspecifika resultat, som t.ex. för vissa läkemedel, bör testet utföras med försöksdjur av lämpligt kön. Som en vägledning för ett vanligt krav på maximalt antal djur skulle det krävas 25–35 djur för en undersökning som utförs enligt de parametrar som fastställs i punkt 33, med tre dosgrupper och parallella negativa och positiva kontrollgrupper (fem djur av ett kön i varje grupp)

BEHANDLINGSSCHEMA

Djuren bör ges dagliga behandlingar under två eller flera dagar (dvs. två eller flera behandlingar i intervall på cirka 24 timmar) och proverna bör samlas in varannan till var sjätte timme (eller vid $T_{\max}$) efter den sista behandlingen (12). Prover från förlängda doseringssystem (t.ex. 28 dagars daglig dosering) är godtagbara. Det har visats att kometmetoden och mikrokärntest av erythrocyter kan kombineras med framgång (10) (19). Man bör dock noggrant överväga logistiken i samband med provtagning av vävnader för komet-analysen förutom de krav som gäller för provtagning av vävnader för andra typer av toxikologiska bedömningar. Skörd 24 timmar efter den sista dosen, vilket är typiskt för en allmän toxicitetsundersökning, är t.ex. olämpligt i de flesta fall (se punkt 40 om provtagningstidpunkter). Användning av andra behandlings- och provtagningsscheman bör motiveras (se tillägg 3). En enda behandling med flera provtagningstillfällen kan tillämpas, men det bör noteras att fler djur kommer att krävas för undersökningar med en enda administrering eftersom provtagningstillfällena är fler. I vissa fall kan detta dock vara att föredra, t.ex. när testkemikalien inducerar överdriven toxicitet efter upprepade administreringar.

Hur testet än genomförs är det godtagbart så länge testkemikalien ger ett positivt svar, eller för en negativ undersökning, så länge direkta eller indirekta bevis till stöd för exponering eller toxicitet för målvävnaderna har visats eller om gränsdosen uppnås (se punkt 36).

Testkemikalier kan även administreras i form av en delad dos, dvs. två behandlingar under en och samma dag med högst två till tre timmars intervall, för att på så sätt underlätta administrering av stora volymer med material. Under dessa omständigheter bör provtagningstillfällena schemaläggas baserat på tidpunkten för den sista doseringen (se punkt 40).

Dosnivåer

Om det inte finns lämpliga data från andra relevanta undersökningar som kan ge vägledning om dosval och en preliminär undersökning därför utförs för att fastställa omfattningen, bör denna undersökning utföras i samma laboratorium, och med samma arter, stammar, kön och behandlingsschema som senare ska användas i huvudundersökningen enligt gällande strategier för preliminära undersökningar. Syftet med undersökningen bör vara att identifiera högsta tolererbara dos (MTD), som definieras som den dos som inducerar små toxiska effekter i förhållande till undersökningsperiodens varaktighet (t.ex. tydliga kliniska tecken som onormalt beteende eller onormala reaktioner, mindre viktminskningar eller cytotoxicitet i målvävnaden, men inte dödlighet eller tecken på smärta, lidande eller ångest som kräver avlivning. För en icke-toxisk testkemikalie med en administrationsperiod på 14 dagar eller mer är den högsta dosen (gränsdosen) 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag. För administrationsperioder på mindre än 14 dagar är den högsta dosen (gränsdosen) 2 000 mg/kg kroppsvikt/dag. Dessa gränser kan variera för vissa typer av testkemikalier (t.ex. humanläkemedel) som omfattas av särskilda krav.

Kemikalier som uppvisar mättnad av toxikokinetiska egenskaper eller inducerar avgiftningsprocesser som kan leda till minskad exponering efter långtidsadministrering kan vara undantag från kriterierna för dosbestämning och bör utvärderas från fall till fall.

För båda akuta och subakuta versioner av kometmetoden bör man, förutom högsta tolererbara dos (MTD, högsta möjliga dos, maximal exponering eller gränsdos) välja en sjunkande sekvens med minst två lämpligt skilda dosnivåer (företrädesvis separerade med mindre än $\sqrt{10}$) för varje provtagningstidpunkt för att visa dosrelaterade responser. Dessa dosnivåer bör helst även täcka ett intervall från maximal toxicitet till svag eller ingen toxicitet. När toxicitet i målvävnaden observeras vid alla testade dosnivåer rekommenderas fortsatta undersökningar med icke-toxiska doser (se punkterna 54–55). Studier som syftar till att mer grundligt undersöka formen för dos-responskurvan kan kräva ytterligare dosgrupper.

Administrering av doser

Den förväntade exponeringsvägen för människor bör beaktas vid utformningen av en analys. Därför kan exponeringsvägar (t.ex. föda, dricksvatten, lokalt subkutant, intravenöst, oralt (via sond), inhalation, intratrakealt eller implantation) väljas som motiverad exponering. Exponeringsvägen bör i alla händelser väljas för att säkerställa lämplig exponering av målvävnaden. Intraperitoneal injektion rekommenderas generellt inte eftersom den inte är en avsedd exponeringsväg för människor, och bör endast användas med specifik vetenskaplig motivering (t.ex. för vissa kontrollämnen, forskningsändamål eller för vissa läkemedel som ges intraperitonealt. Den maximala vätskevolymen som kan administreras genom sondmatning eller injektion vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen får inte överstiga 1 ml per 100 g kroppsvikt, utom för vattenlösningar där volymen kan uppgå till 2 ml per 100 g kroppsvikt. Användning av större volymer än så (om det är tillåtet enligt djurskyddslagstiftningen) ska motiveras. När så är möjligt bör olika dosnivåer uppnås genom en justering av koncentrationen av doseringsberedningen för att säkerställa en konstant volym i förhållande till kroppsvikt vid alla dosnivåer.

Provtagningstid

Provtagningstiden är en kritisk variabel eftersom den avgörs av den period som behövs för att testkemikalierna ska nå högsta koncentration i målvävnaden och inducera brott på DNA-strängar, men innan dessa brott avlägsnas, repareras eller leder till celldöd. Vissa av de skador som leder till brott på DNA-strängen och som detekteras med kometmetoden kan vara mycket kortvariga, åtminstone för vissa kemikalier testade in vitro (52) (53). Om sådana övergående DNA-skador misstänks bör åtgärder därför vidtas för att begränsa förlusten genom att säkerställa att vävnaderna provtas tillräckligt tidigt, eventuellt tidigare än de standardtidpunkter som anges nedan. De optimala provtagningstidpunkterna kan vara specifika för kemikalien eller administreringsvägen, t.ex. vid snabb vävnadsexponering med intravenös administrering eller exponering via inandning. Provtagningstillfällena bör följaktligen bestämmas med utgångspunkt i kinetiska data om sådana finns tillgängliga (t.ex. den tidpunkt (T_{max}) då högsta värde för plasma eller vävnadskoncentration (C_{max}) uppnås, eller vid stabilt tillstånd vid flera administreringar. Om kinetiska data inte finns tillgängliga är en lämplig kompromiss för mätningen av gentoxicitet att ta proverna 2–6 timmar efter den sista behandlingen för två eller flera behandlingar, eller både 2–6 timmar och 16–26 timmar efter en enda behandling. Det är dock viktigt att se till att alla djur obduceras samtidigt efter den sista (eller enda) dosen. Information om förekomsten av toxiska effekter hos målorganen (i förekommande fall) kan även användas för att välja lämpliga provtagningstillfällen.

Observationer

Allmänna kliniska observationer av djurens hälsa bör göras och registreras minst en gång per dag, helst vid samma tidpunkt med hänsyn till maximalt förväntade effekter efter doseringen (54). Minst två gånger dagligen bör djuren observeras beträffande morbiditet och mortalitet. För undersökningar med längre varaktighet bör djuren vägas minst en gång i veckan och när testperioden avslutas. Foderkonsumtionen bör mätas varje gång fodret ändras och minst en gång i veckan. Om testkemikalien tillförs via dricksvattnet bör även vattenkonsumtionen mätas vid varje byte av vatten och minst en gång i veckan. Djur som uppvisar icke-dödliga indikatorer på överdriven toxicitet bör avlivas innan testperioden avslutas och används vanligen inte för komet-analysen.

Vävnadsinsamling

Eftersom det är möjligt att undersöka induktion av brott på DNA-strängar (kometer) i praktiskt taget alla vävnader bör valet av de vävnader som ska samlas in tydligt motiveras och grundas på syftet med undersökningen samt eventuell befintlig ADME, gentoxicitet, cancerogenitet eller andra toxicitetsdata för de undersökta testkemikalierna. Viktiga faktorer för övervägande bör omfatta administreringsväg (baserat på sannolika mänskliga exponeringsvägar), förutsagd vävnadsdistribution och absorption, metabolismens funktion och möjlig verkningsmekanism för testkemikalierna. Levern är den vävnad som har undersökts oftast och som det finns mest data för. I avsaknad av bakgrundsinformation och om inga specifika vävnader av intresse identifieras är provtagning av

levern motiverat eftersom levern är det primära organet för xenobiotisk metabolism och ofta exponeras starkt både för huvudämnen och metaboliter. I vissa fall kan granskning av en direkt kontaktpunkt (t.ex. den glandulära magsäcken eller tolvfingertarmen/tomtarmen för oralt administrerade kemikalier eller lungorna för kemikalier som inandas) vara mest relevant. Kompletterande eller alternativa vävnader bör väljas baserat på de särskilda syftena med testet men kan även vara användbara för att undersöka flera vävnader hos samma djur, under förutsättning att laboratoriet har visat att det är kvalificerat för sådana vävnader och för att hantera flera vävnader samtidigt.

Beredning av prover

För de processer som beskrivs i följande punkter (44–49) är det viktigt att alla lösningar eller stabila suspensioner används före sista förbrukningsdatum eller att nya lösningar bereds vid behov. I de följande punkterna anses även tidsåtgången för att i) avlägsna varje vävnad efter obduktion, ii) behandla varje vävnad i cell-/kärnsuspensioner, och iii) behandla suspensionen och bereda analysplattformarna vara kritiska variabler (se definitioner, tillägg 1). Godtagbar tidsåtgång för varje steg bör fastställas när metoden etableras och laboratoriet visar att det är kvalificerat för testet.

Djuren avlivas enligt gällande djurskyddslagstiftning och 3R-principerna vid lämpliga tidpunkter efter den sista behandlingen med testkemikalien. De utvalda vävnaderna avlägsnas och dissekeras och en del samlas in för undersökning med kometmetoden. En del av samma vävnad bör samtidigt skäras ut och placeras i formaldehydlösning eller lämpligt fixativ för en eventuell histopatologisk analys (se punkt 55) enligt standardmetoderna (12). Den vävnad som ska undersökas med kometmetoden placeras i en buffert för finfördelning, sköljs ordentligt med kall buffert för att avlägsna restblod och lagras i iskall buffert fram till behandlingen. Perfusion in situ kan också utföras, t.ex. för lever och njure.

Det finns många publicerade metoder för cell-/kärnisolering, bland annat finfördelning av vävnader som lever och njure, skrapning av slemhinneytor för matsmältningsorgan, homogenisering och enzymatisk nedbrytning. I JaCVAM-valideringsförsöket undersöktes endast isolerade celler. Därför är isolerade celler att föredra när metoden etableras så att laboratoriet kan hänvisa till JaCVAM-testdata för att visa att det är kvalificerat. Man har dock visat att inga större skillnader uppstod i försöksresultatet beroende på om man använde isolerade celler eller kärnor (8). Andra metoder för att isolera celler/kärnor (t.ex. homogenisering, finfördelning, enzymatisk nedbrytning och nätfiltrering) gav jämförbara resultat (55). Följaktligen kan antingen isolerade celler eller isolerade kärnor användas. Laboratoriet bör noggrant utvärdera och validera vävnadsspecifika metoder för isolering av enskilda celler/kärnor. Såsom diskuteras i punkt 40 kan vissa av de skador som leder till brott på DNA-strängen som detekteras med kometmetoden kan vara mycket kortvariga (52) (53). Vilken metod som än används för att bereda suspensionerna med enskilda celler/kärnor är det därför viktigt att vävnaderna behandlas så snart som möjligt efter avlivningen av djuren och att de förvaras under förhållanden som minskar avlägsnandet av skador (t.ex. genom förvaring i låg temperatur). Cellsuspensionerna bör hållas iskalla tills de är färdiga för användning, så att laboratoriet kan visa minimal variation mellan proverna och lämpliga positiva och negativa kontrollresponser.

BEREDNING AV ANALYSPLATTFORMAR

Analysplattformarna bör beredas så snart som möjligt (helst inom en timme) efter beredningen av cellerna/kärnorna. Temperaturen och tidsintervallet mellan avlivning och beredningen av analysplattformar bör noggrant kontrolleras och valideras enligt laboratoriets betingelser. Den volym cellsuspension som tillsätts till agaros vid låg smältpunkt (vanligen 0,5–1,0 %) för att bereda analysplattformarna bör inte minska procentandelen av agaros med låg smältpunkt till mindre än 0,45 %. Optimal celltäthet fastställs med det bildanalyssystem som används för att registrera kometerna.

Lysering

Lyseringsbetingelserna är också en kritisk variabel. Den kan störa brott på strängar som är resultatet av specifika typer av DNA-modifieringar (vissa DNA-alkyleringar och DNA-addukter). Lyseringsbetingelserna bör därför hållas så konstanta som möjligt för alla analysplattformar i försöket. När analysplattformarna har beretts sänks de ned i kylld lyseringslösning i minst en timme (eller över natten) vid cirka 2–8 °C under dämpade ljusförhållanden, t.ex. gult ljus (eller ljusbeständighet), för att undvika exponering för vitt ljus som kan innehålla UV-komponenter. Efter denna inkubationsperiod sköljs analysplattformarna för att avlägsna rester av rengöringsmedel och salter före det alkaliska upplösningsteget. Detta kan göras med renat vatten, neutraliseringsbuffert eller fosfatbuffer. Elektroforesbuffert kan också användas. På så sätt upprätthålls de alkaliska förhållandena i elektroforeskammaren.

Upplösning och elektrofores

Analysplattformarna placeras slumpmässigt på plattformen på en elektroforesenhet av undervattenstyp som innehåller tillräckligt med elektroforeslösning så att analysplattformarnas ytor täcks fullständigt (täckdjupet bör också vara konsekvent mellan körningarna). I andra typer av elektroforesenheter för kometmetoden, dvs. med aktiv kylning, cirkulation och strömförsörjning av hög kapacitet kommer en högre lösningsmedelstäckning att leda till högre ström samtidigt som spänningen hålls konstant. En balanserad utformning bör användas för placeringen av analysplattformarna i elektroforestanken för att begränsa effekterna av eventuella trender eller en kanteffekt inom tanken och minimera skillnaderna mellan satserna, dvs. i varje elektroforeskörning. Därför bör antalet objektglas från varje djur i undersökningen vara detsamma och prover från olika doseringsgrupper och negativa och positiva kontroller bör inbegripas. Analysplattformarna bör lämnas i minst 20 minuter så att DNA:s kan lösa upp sig och sedan genomgå elektrofores under kontrollerade förhållanden som maximerar känsligheten och försökets dynamiska intervall (dvs. leda till godtagbara nivåer av procentandelen DNA i kometsvansar för negativa och positiva kontroller som maximerar sensitiviteten). Graden av DNA-migration associeras linjärt med elektroforesens varaktighet, och även med potentialen (V/cm). Baserat på JaCVAM-testet kan detta vara 0,7 V/cm i minst 20 minuter. Elektroforesens varaktighet anse vara en kritisk variabel och tiden bör därför ställas in för att optimera det dynamiska intervallet. Längre elektroforestider (t.ex. 30 eller 40 minuter för att maximera sensitiviteten) leder vanligen till starkare positiva responser med kända mutagener. Längre elektroforestider kan dock även leda till överdriven migration i kontrollproverna. Spänningen bör hållas konstant i varje försök och variationen i andra parametrar bör hållas inom ett snävt fastställt intervall. I JaCVAM-testet gav t.ex. 0,7 V/cm en startström på 300 mA. Buffertdjupet bör justeras för att uppnå erforderliga betingelser och upprätthållas under försöket. Strömmen i början och slutet av elektroforesperioden bör registreras. Optimala betingelser bör därför fastställas när det berörda laboratoriet visar att det är kvalificerat att hantera varje undersökt vävnad. Elektroforeslösningens temperatur under upplösning och elektrofores bör hållas låg, vanligen 2–10 °C (10). Elektroforeslösningens temperatur bör registreras i början av upplösningen, när elektroforesen inleds och i slutet av elektroforesen.

När elektroforesen har slutförts sänks analysplattformarna ned/sköljs i neutraliseringsbufferten i minst fem minuter. Ny gel kan färgas in och registreras som "ny" (t.ex. inom 1–2 dagar) eller torkas ut för senare registrering (t.ex. inom 1–2 veckor efter infärgning) (56). Betingelserna bör dock valideras under kvalifikationsprocessen och historiska data bör inhämtas och registreras separat för varje betingelse. I det senare fallet torkas analysplattformarna ut genom nedsänkning i absolut etanol i minst fem minuter. Låt dem lufttorka. Därefter lagras de, antingen i rumstemperatur eller i en behållare i kylskåp, tills de registreras.

Mätmetoder

Kometer bör registreras kvantitativt med ett automatiskt eller halvautomatiskt bildanalyssystem. Analysplattformarna färgas in med lämplig fluorescerande färg, t.ex. SYBR Gold, Green I, propidiumjodid eller etidiumbromid, och mäts vid en lämplig förstoring (t.ex. 200 x) i ett mikroskop med epi-fluorescens och lämpliga detektorer eller en digital kamera (t.ex. CCD).

Cellerna kan klassificeras i tre kategorier enligt beskrivningen i atlasen över kometbilder (57), nämligen registrerbara, icke-registrerbara och "hedgehog" (diskuteras närmare i punkt 56). För att undvika artefakter bör endast registrerbara celler (tydligt definierade komethuvuden och kometsvansar utan störning från närliggande celler) klassificeras för procentandel DNA i kometsvans. Frekvensen av icke-registrerbara celler behöver inte redovisas. Frekvensen av hedgehogs bör bestämmas baserat på visuell registrering (eftersom avsaknad av tydligt definierade komethuvuden och kometsvansar innebär att de inte kan upptäckas ordentligt med bildanalys) av minst 150 celler per prov (diskuteras närmare i punkt 56) och dokumenteras separat.

Alla analysplattformar, inklusive analysplattformar med positiva och negativa kontroller, bör ges en oberoende kodning och klassificeras "blindade" så att bedömare inte känner till behandlingsbetingelserna. Minst 150 celler bör analyseras för varje prov (per vävnad per djur) (exklusive hedgehogs – se punkt 56). Klassificering av 150 celler per djur för minst fem djur per dos (färre i den parallella positiva kontrollen – se punkt 29) ger lämplig statistisk kraft enligt analysen av Smith m.fl. 2008 (5). Om analysplattformar används kan cellerna komma från två eller tre analysplattformar som klassificerats per prov om fem djur per grupp används. Flera områden av analysplattformarna bör observeras vid en täthet som säkerställer att ingen överlappning av kometsvansarna förekommer. Klassificering vid analysplattformarnas kanter bör undvikas.

Brott på DNA-strängar i kometmetoden kan mätas med oberoende endpoints, t.ex. procentandel DNA i kometsvans, kometsvanslängd och kometsvansmoment. Samtliga tre mätningar kan göras om lämplig bildanalysprogramvara används. Procentandelen DNA i kometsvans (även benämnd % *tail intensity*, % intensitet i kometsvans) rekommenderas för utvärdering och tolkning av resultaten (12) (40) (41) (42) och bestäms av DNA-fragmentens intensitet i kometsvansen, uttryckt som procentandel av cellens totala intensitet (13).

Vävnadsskada och cytotoxicitet

Positiva resultat i kometmetoden kanske inte enbart beror på gentoxicitet. Toxicitet i målvävnaderna kan även leda till ökad DNA-migration (12) (41). Omvänt förekommer låg eller måttlig cytotoxicitet ofta i samband med kända gentoxiner (12), vilket visar att det inte är möjligt att skilja mellan DNA-migration som inducerats av genotoxicitet och DNA-migration som inducerats av cytotoxicitet enbart i kometmetoden. Om ökning i DNA-migrationen observeras bör man dock undersöka en eller flera indikatorer för cytotoxicitet, eftersom detta kan underlätta tolkningen av resultaten. Ökningar i DNA-migrationen bör tolkas med försiktighet om det finns tydliga bevis för cytotoxicitet.

Det finns många förslag på mått för cytotoxicitet, och bland dessa anses histopatologiska ändringar vara ett relevant mått på vävnadstoxicitet. Observationer såsom inflammation, cellinfiltrering och apoptotiska och nekrotiska ändringar har kopplats till ökning i DNA-migrationen. Såsom visats av JaCVAM:s valideringsförsök (12) finns det dock ingen definitiv förteckning över histopatologiska ändringar som alltid kan kopplas till ökad DNA-migration. Förändringar av de kliniska kemimåtten (t.ex. AST, ALT) kan också ge användbar information om vävnadsskador och kompletterande indikatorer som kaspasaktivering, TUNEL-infärgning, Annexin V-infärgning osv. kan övervägas. Det finns dock begränsade publicerade data om användningen av det sistnämnda alternativet i in vivo-undersökningar och uppgifterna är inte alltid tillförlitliga.

Hedgehogs (eller moln, spökceller) är celler som uppvisar en mikroskopisk bild bestående av ett litet eller obefintligt huvud och långa diffusa kometsvansar. Dessa celler anses vara allvarligt skadade, även om etiologin för hedgehogs är osäker (se tillägg 3). På grund av utseendet är bildanalysmätningar av procentandelen DNA i kometsvans inte tillförlitliga för hedgehogs och de bör därför utvärderas separat. Förekomsten av hedgehogs bör registreras och redovisas. Eventuella relevanta ökning i antas bero på testkemikalien bör undersökas och tolkas med försiktighet. Kunskap om testkemikaliernas eventuella verkningssätt kan vara till hjälp för sådana överväganden.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

Djuret är försöksenheten och därför ska både individuella data för djuren och sammanfattade resultat presenteras i tabellform. På grund av den hierarkiska datastrukturen bör medelvärde för procentandelen DNAi kometsvans för varje analysplattform bestämmas och genomsnittet av medelvärdena beräknas för varje djur (12). Därefter bestäms medelvärden för individuella djur för att få fram ett medelvärde för gruppen. Alla dessa värden ska ingå i rapporten. Alternativa metoder (se punkt 53) kan användas om de är vetenskapligt och statistiskt motiverade. Den statistiska analysen kan utföras med hjälp av olika metoder (58) (59) (60) (61). Vid valet av statistisk metod bör man överväga behovet av omvandling (t.ex. log eller kvadratrot) av uppgifterna och/eller att lägga till en låg siffra (t.ex. 0,001) till alla värden (även icke-noll) för att begränsa effekten av nollcellvärden. Detta diskuteras i ovanstående litteraturhänvisningar. Analysuppgifter för behandling/samverkan mellan könen när båda könen används samt den efterföljande dataanalysen med eller utan skillnader anges i tillägg 2. Uppgifter om toxicitet och kliniska tecken bör också rapporteras.

Kriterier för godkännande

Testet måste uppfylla följande kriterier för att godkännas:

- a. Den parallella negativa kontrollen måste anses godtagbar för registrering i laboratoriets historiska databas över negativa kontroller enligt punkt 16.
- b. Parallella positiva kontroller (se punkt 29) bör framkalla reaktioner som överensstämmer med de kontroller som genereras i den historiska databasen över positiva kontroller och ge en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.
- c. Ett tillräckligt antal celler och doser ska ha analyserats (punkterna 52 och 36–38).
- d. Urvalskriterierna för högsta dos överensstämmer med de kriterier som beskrivs i punkt 36.

Utvärdering och tolkning av resultaten

Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart positiv om följande gäller:

- a. Åtminstone en av testdoserna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.
- b. Ökningen är dosrelaterad när den utvärderas med ett lämpligt trendtest.
- c. Resultat faller utanför distributionen för historiska negativa kontrolldata för en viss art, vehikel, administreringsväg, vävnad och antal administreringar.

Om alla dessa kriterier är uppfyllda anses testkemikalien kunna inducera brott på DNA-strängar i de vävnader som undersöks i detta testsystem. Om endast ett eller två av dessa kriterier är uppfyllda, se punkt 62.

Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart negativ om följande gäller:

- a. Ingen av testkoncentrationerna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.
- b. Det finns ingen koncentrationsrelaterad ökning vid utvärdering med ett lämpligt trendtest.
- c. Alla resultat faller inom distributionen för historiska negativa kontrolldata för en viss art, vehikel, administreringsväg, vävnad och antal administreringar.
- d. Det finns direkta eller indirekta bevis som stöder exponering av målvävnaden eller dess toxicitet.

Testkemikalien anses inte kunna inducera brott på DNA-strängar i de vävnader som undersöks i detta testsystem.

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

Om responsen varken är klart negativ eller klart positiv (dvs. alla kriterier i punkt 59 eller 60 är inte uppfyllda) och för att göra det lättare att fastställa resultatets biologiska relevans bör uppgifterna fackgranskas och/eller undersökas ytterligare om det är vetenskapligt motiverat. Det kan även vara användbart att klassificera ytterligare celler (i förekommande fall) eller upprepa försöket, eventuellt med optimerade försöksbetingelser (t.ex. dosintervall, andra administreringsvägar, andra provtagningstillfällen eller andra vävnader).

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

För att bedöma den biologiska relevansen av ett positivt eller tvetydigt krävs information om cytotoxicitet i målvävnaden (se punkterna 54–55). Om positiva eller otvetydiga resultat endast observeras vid förekomst av tydliga bevis på cytotoxicitet anses undersökningsresultaten vara tvetydiga för gentoxicitet om det inte finns tillräckligt med information för en definitiv slutsats. Vid negativa undersökningsresultat där det finns tecken på toxicitet vid alla testade doser kan en ytterligare undersökning av icke-toxiska doser behövas.

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

- Ursprung, satsnummer om sådant finns.
- Testkemikalies stabilitet, sista förbrukningsdatum eller sista datum för upprepad analys, om känt.

Monokomponentämne:

- Fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.
- Kemiska beteckningar, såsom IUPAC- eller CAS-beteckning, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturell formel, renhet, kemisk beteckning på föroreningar i förekommande fall och om möjligt osv.

Multikomponentämne, UVCB och blandningar:

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

Lösningsmedel/vehikel:

- Motivering för valet av lösningsmedel/vehikel.
- Löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt.
- Beredning av doser.
- Analytiska bestämningar av beredningar (t.ex. stabilitet, homogenitet, nominella koncentrationer).

Försöksdjur:

- Använd art/stam och vetenskapliga och etiska motiveringar till valet.
- Djurens antal, ålder och kön.

- Ursprung, inhysning, foder, berikning osv.
- Individuell vikt hos försöksdjuren vid försökets början och slut, inklusive kroppsviktsintervall, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp.

Testbetingelser:

- Positiva och negativa kontrolldata (vehikel/lösningsmedel).
- Resultat från en preliminär undersökning (om en sådan utförs).
- Grund för valet av dosnivå.
- Uppgifter om beredning av testkemikalien.
- Uppgifter om administreringen av testkemikalien.
- Grund för administreringsväg.
- Injektionspunkt (för subkutana eller intravenösa undersökningar).
- Metoder för provberedning, i förekommande fall histopatologiska analyser, särskilt för kemikalier som ger positiv kometrespons.
- Grund för valet av vävnad.
- Metoder för att verifiera att testkemikalien nått målvävnaden eller den allmänna cirkulationen om negativa resultat erhålls.
- Faktisk dos (mg/kg kroppsvikt/dag) som beräknats genom dietens/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (ppm) och konsumtion, i tillämpliga fall.
- Uppgifter om diet- och vattenkvalitet.
- Detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman samt motivering av valen (t.ex. toxikokinetiska data om sådana finns tillgängliga).
- Smärtlindringsmetod, bedövningsmedel.
- Metod för avlivning.
- Förfaranden för att isolera och bevara vävnader.
- Metoder för beredning av suspensioner med enstaka celler/kärnor.
- Ursprung och partinumner för alla reagenser (om möjligt).
- Utvärderingsmetoder för cytotoxicitet.
- Elektroforesbetingelser.
- Färgningstekniker.
- Metoder för klassificering och mätning av kometer.

Resultat:

- Allmänna kliniska observationer i förekommande fall, före och under testperioden för varje djur.
- Bevis på cytotoxicitet i förekommande fall.
- För undersökningar som varar längre än en vecka: individuell vikt under försöket, inklusive kroppsviktsintervall, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp samt foderkonsumtion.

- Dos-responsförhållande, då detta är uppenbart.
- För varje vävnad/djur, procentandel DNAi kometsvans (eller andra mått i förekommande fall) samt medelvärden per analysplattform, medelvärden per djur och medelvärden per grupp.
- Parallella och historiska negativa kontrolldata med omfång, medelvärden/medianvärden och standardavvikelser för varje utvärderad vävnad.
- Parallella och historiska positiva kontrolldata.
- För andra vävnader än lever, en dos-responskurva utifrån den positiva kontrollen. Dos-responskurvan kan tas fram från data som samlats in under kvalifikationsprocessen (se punkterna 16–17) och bör åtföljas av en motivering med hänvisningar till aktuell litteratur, för att visa att omfattningen och spridningen av responser på kontroller hos vävnaden i fråga är lämpliga.
- Statistiska analyser och metoder samt kriterier för bedömning av responsen som positiv, negativ eller tvetydig.
- Frekvens av hedgehogs i varje grupp och per djur.

Diskussion av resultaten.

Slutsats

Litteraturhänvisningar

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, s. 114–132.
- (2) Brendler-Schwaab, S. m.fl. (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, vol. 20/4, s. 245–254.
- (3) Burlinson, B. m.fl. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, vol. 627/1, s. 31–5.
- (4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, vol. 817, s. 143–163.
- (5) Smith, C.C. m.fl. (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, vol. 23/3, s. 233–240.
- (6) Hartmann, A. m.fl. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, vol. 18/1, s. 45–51.
- (7) McKelvey-Martin, V.J. m.fl. (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, vol. 288/1, s. 47–63.
- (8) Tice, R.R. m.fl. (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 35/3, s. 206–221.
- (9) Singh, N.P. m.fl. (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, vol. 175/1, s. 184–191.
- (10) Rothfuss, A. m.fl. (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, s. 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 och 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, s. 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, s. 207–214.
- (15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, vol. 26/3, s. 249–261.
- (16) Rothfuss, A. m.fl. (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, s. 108–120.
- (17) Kushwaha, S. m.fl. (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, s. 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, s. 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, s. 7–19.
- (20) Recio, L. m.fl. (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, s. 149–162.
- (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, s. 621–623.
- (22) Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations**, *Mutagenesis*, vol. 19/1, s. 51–59.
- (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, s. 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, s. 175–178.
- (25) Toyozumi, T. m.fl. (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, s. 175–180.
- (26) Struwe, M. m.fl. (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, vol. 7/2, s. 240–249.
- (27) Wada, K. m.fl. (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, s. 26–30.
- (28) Wang, A. m.fl. (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, s. 51–59.

- (29) Burlinson, B. m.fl. (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, s. 31–35.
- (30) Jackson, P. m.fl. (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, s. 486–500.
- (31) Sasaki, Y.F. m.fl. (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, s. 629–799.
- (32) Sekihashi, K. m.fl. (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, vol. 517/1-2, s. 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, s. 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, s. 275–282.
- (35) Cordelli, E. m.fl. (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, vol. 160/4, s. 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, s. 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, s. 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, s. 165–181.
- (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, s. 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), s. 7–16.
- (41) Burlinson, B. m.fl. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, vol. 627/1, s. 31–35.
- (42) Kumaravel, T.S. m.fl. (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, vol. 25/1, s. 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, s. 689–695.
- (44) Møller, P. m.fl. (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, s. 109–111.
- (45) Forchhammer, L. m.fl. (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, vol. 25/2, s. 113–123.
- (46) Azqueta, A. m.fl. (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, vol. 724/1-2, s. 41–45.

- (47) Hayashi, M. m.fl. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, vol. 723/2, s. 87–90.
- (48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, John Wiley and Sons, New York, andra utgåvan.
- (49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS nr 123).
- (50) Kapitel B.8 i denna bilaga: Subakut inhalationstoxicitet: 28-dagars studie.
- (51) Kapitel B.29 i denna bilaga: Subkronisk inhalationstoxicitet: 90-dagars studie.
- (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, s. 141–145.
- (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, s. 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, s. 50–54.
- (56) Hartmann, A. m.fl. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, vol.18/1, s.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, s. 109–119.
- (59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, vol. 18/2, s. 167–175.
- (60) Bright, J. m.fl. (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, vol. 10/6, s. 485–493.
- (61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, vol. 23/3, s. 171–182.
-

Tillägg 1

DEFINITIONER

Alkaline single cell gel electrophoresis (enkelcell-gelelektrofores under alkaliska betingelser): känslig teknik för detektion av primära DNA-skador i individuella celler/kärnor.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Komet: den form som nukleoider antar efter att ha utsatts för ett elektroforesfält. Namnet beror på att de liknar kometer: komethuvudet är kärnan och kometsvansen består av DNA som migrerar ut från kärnan i det elektriska fältet.

Kritisk variabel/parameter: protokollvariabel för vilken en liten ändring kan ha stor inverkan på försökets slutsatser. Kritiska variabler kan vara vävnadsspecifika. De kritiska variablerna bör inte ändras, särskilt inte inom ett test, utan att man först överväger hur ändringen kommer att påverka försöksresponsen, t.ex. enligt omfattning och variabilitet i de positiva och negativa kontrollerna. Ändringar av kritiska variabler som gjorts under testet eller jämfört med laboratoriets standardprotokoll ska anges i testrapporten och varje ändring ska motiveras.

Intensitet i kometsvans eller procentandel DNA i kometsvans (Tail intensity eller % tail DNA): motsvarar intensiteten i kometsvansen i förhållande till total intensitet (komethuvud plus kometsvans). Avspeglar antalet DNA-brott, uttryckt i procent.

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

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

Tillägg 2

UTFORMNING AV FAKTORFÖRSÖK FÖR IDENTIFIERING AV SKILLNADER MELLAN KÖNEN I IN VIVO COMET ASSAY**Utformning och analys av faktorförsök**

I denna utformning testas minst fem hanar och fem honor vid varje koncentrationsnivå, vilket innebär att minst 40 djur måste användas (20 hanar och 20 honor plus relevanta positiva kontroller).

Detta är ett av de enklaste faktorförsöken och det motsvarar en tvåvägs-variationsanalys med kön och koncentrationsnivå som huvudsakliga effekter. Data kan analyseras med hjälp av många vanliga statistiska programvarupaket såsom SPSS, SAS, STATA, Genstat samt med hjälp av R.

Analysen delar upp variationen i datauppsättningen mellan kön, koncentrationer och interaktionen mellan kön och koncentrationer. Var och en av termerna testas mot en uppskattning av variationerna mellan replikatdjuren inom djurgrupper av samma kön som ges samma koncentration. Fullständig information om den underliggande metoden finns i många statistiska läroböcker (se litteraturhänvisningar) och i hjälpsnitt i statistiska paket.

Nästa steg i analysen är att kontrollera interaktionstermen "kön x koncentration" i ANOVA tabellen ⁽¹⁾. I avsaknad av en signifikant interaktionsterm ger de kombinerade värdena mellan könen eller koncentrationsnivåerna giltiga statistiska test mellan nivåerna, baserat på den sammanslagna inomgruppsvariationen enligt ANOVA.

Nästa steg i analysen är att dela upp uppskattningen av variationen mellan koncentrationerna i kontraster, som möjliggör ett test avseende linjära och kvadratiske kontraster i responsen mellan koncentrationsnivåerna. Om en signifikant variation i kön x koncentration förekommer kan även denna term delas upp i interaktionskontraster enligt följande: linjära kontraster x kön och kvadratiske kontraster x kön. Med hjälp av dessa termer kan man testa om koncentrationsresponsen är parallell för de två könen eller om den skiljer sig åt.

Uppskattningen av den sammanslagna inomgruppsvariationen kan användas för parvisa test av skillnaderna mellan medelvärdena. Dessa jämförelser kan göras mellan medelvärdena för könen och medelvärdena för de olika koncentrationsnivåerna, t.ex. för jämförelser med de negativa kontrollnivåerna. Om det finns en signifikant interaktion kan man jämföra medelvärden för olika koncentrationer för samma kön eller medelvärden för båda könen vid samma koncentration.

Litteraturhänvisningar

Teori, utformning, metod, analys och tolkning av faktorförsök diskuteras i många statistiska läroböcker, från den enklaste tvåfaktorsanalysen till mer komplexa former som används i försöksutformningsmetoder. Följande förteckning är icke-uttömmande: Vissa böcker innehåller etablerade exempel på jämförbara utformningar, i vissa fall med koder för att köra analysen med hjälp av olika programvarupaket.

- (1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. och 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. och 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⁾ Statistiker som använder modelleringsmetoder som allmänna linjära modeller (GLM) kan använda analysen på ett annorlunda men jämförbart sätt. Det är inte nödvändigt att härleda den traditionella ANOVA-modellen, som bygger på algoritmiska metoder för statistisk beräkning som utvecklades före dataåldern.

-
- (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 och Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.
-

Tillägg 3

AKTUELLA BEGRÄNSNINGAR HOS FÖRSÖKET

På grund av nuvarande kunskapsstatus har kometmetoden flera begränsningar. Det förväntas att dessa begränsningar kommer att minskas eller definieras mer snävt allteftersom erfarenheterna av tillämpningen av försöket ökar för att bemöta säkerhetsfrågor i lagstiftningssammanhang.

1. Vissa typer av DNA-brott kan vara kortlivade, dvs. kan repareras för snabbt för att kunna observeras 24 timmar eller senare efter den sista dosen. Det saknas uppgifter om typerna av kortlivade skador och de kemikalier som kan orsaka sådana skador. Den tidsperiod då denna typ av skada kan detekteras är inte heller känd. Optimala provtagningstillfällen kan även vara specifika för kemikalien eller administreringsvägen och bör därför fastställas med utgångspunkt i kinetiska data (t.ex. den tidpunkt ($T_{\max}$) då högsta värde för plasma eller vävnadskoncentration ($C_{\max}$) uppnås) om sådana data finns tillgängliga. Enligt de flesta valideringsstudier som stöder denna testmetod bör obduktion utföras två eller tre timmar efter administreringen av slutdosen. Enligt de flesta studier i den publicerade litteraturen bör slutdosen ges mellan två och sex timmar före avlivning. Dessa erfarenheter användes som underlag för testmetodens rekommendation att slutdosen, om inte annat anges i tillgängliga data, bör administreras vid en angiven tidpunkt mellan två och sex timmar före obduktion.
2. Det finns inga uppgifter om testets känslighet för detektion av kortlivade DNA-skador efter administrering i foder eller dricksvatten jämfört med administrering via sond. DNA-skador har detekterats efter administrering i foder och dricksvatten, men det finns relativt få sådana rapporter jämfört med den mycket större erfarenheten av administrering via sond eller intraperitonealt (i.p.). Försökets känslighet kan därför minskas för kemikalier som inducerar kortlivad skada och som administreras via föda eller dricksvatten.
3. Inga interlaborativa undersökningar har utförts av andra vävnader än lever och magsäck. Därför saknas rekommendationer om hur en känslig och reproducerbar respons uppnås i andra vävnader än lever, t.ex. förväntade positiva och negativa kontrollintervall. För lever har man inte kunnat enas om att fastställa en lägre gräns även för det negativa kontrollvärdet.
4. Även om flera publikationer visar på en störande effekt på cytotoxicitet in vitro finns mycket få in vivo-data, och därför kan inget särskilt cytotoxicitetsmått rekommenderas. Histopatologiska förändringar såsom inflammation, cellinfiltration och apoptotiska och nekrotiska ändringar har kopplats till öknings i DNA-migrationen. Såsom visats av JaCVAM:s valideringsförsök (OECD, 2014) leder dessa ändringar inte alltid till positiva komet-resultat och därför finns ingen definitiv förteckning över histopatologiska ändringar som alltid kan kopplas till ökad DNA-migration. Hedgehogs (eller moln, spökceller) har tidigare föreslagits som en indikator på cytotoxicitet, men etiologin för hedgehogs är osäker. Det finns data som tyder på att de kan orsakas av kemikalierrelaterad cytotoxicitet, mekanisk/enzyminducerad skada som uppstår under provberedningen (Guerard m.fl., 2014) och/eller en mer extrem effekt av testkemikaliens gentoxicitet. Andra data tyder på att de beror på omfattande men kanske reparerbar DNA-skada (Lorenzo m.fl., 2013).
5. Vävnader och cellkärnor har med framgång frysts ned för senare analys. Detta leder vanligen till en mätbar effekt av responsen på vehikeln och den positiva kontrollen (Recio m.fl., 2010; Recio m.fl., 2012, Jackson m.fl., 2013). Om nedfrysning används ska laboratoriet visa att det är kvalificerat för frysningssmetoder och bekräfta godtagbara låga intervall för procentandelen DNA i kometsvans i målvävnaderna hos vehikelbehandlade djur samt att positiva responser fortfarande kan detekteras. Olika metoder för nedfrysning av vävnader beskrivs i litteraturen. För närvarande råder det dock inte enighet om det bästa sättet att frysa ned och tina upp vävnader och hur man bedömer huruvida en eventuellt ändrad respons kan påverka testets sensitivitet.
6. Nya uppgifter visar att förteckningen över kritiska variabler kommer att bli kortare och parametrarna för kritiska variabler mer exakt definierade (Guerard m.fl., 2014).

Litteratur

- (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, s. 114–121.
- (2) Jackson, P. m.fl. (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, vol. 28/6, s. 699–707.
- (3) Lorenzo, Y. m.fl. (2013), **The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead**, *Mutagenesis*, vol. 28/4, s. 427–432.
- (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, nr 195 och 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.* 35:149–162.
- (6) Recio, L. m.fl. (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 53/2, s. 101–113.”

(16) I del C ska kapitel C. 13 ersättas med följande:

”C.13 Bioackumulering i fisk: exponering via vatten och föda

INLEDNING

Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 305 (2012). Revisionen av denna testmetod har ett dubbelt syfte. För det första är syftet att inbegripa ett lämpligt bioackumuleringstest med exponering via föda⁽¹⁾ för att fastställa bioackumuleringspotentialen hos ämnen med mycket dålig upplösningsförmåga i vatten. Det andra syftet är att skapa en testmetod där man om så är lämpligt använder färre fiskar av djurskyddsskal, samtidigt som den är mer kostnadseffektiv.

Under de år som gått sedan den konsoliderade testmetoden C.13 (1) antogs har många ämnen testats och både laboratorierna och tillsynsmyndigheterna har vunnit avsevärd erfarenhet. Detta har lett till slutsatsen att testets komplexitet kan minskas om specifika kriterier är uppfyllda (jfr punkt 88) och att en stegvis strategi kan tillämpas. Erfarenheten har också visat att biologiska faktorer som tillväxt och fetthalt hos fisk kan ha en stark inverkan på resultaten och därför kan behöva beaktas. Dessutom har man insett att det kanske inte är tekniskt möjligt att testa ämnen som har en mycket dålig upplösningsförmåga i vatten. För ämnen med mycket dålig upplösningsförmåga i vatten i vattenmiljön kan exponering via vatten vara av begränsad betydelse jämfört med administrering via föda. Detta har lett till utvecklingen av en testmetod där fisk exponeras via föda (jfr punkterna 7–14 samt 97 ff.). Validering (provning jämförelse) av testet med exponering via föda gjordes 2010 (51).

De viktigaste förändringarna är följande:

- Testning av endast en testkoncentration kan anses vara tillräcklig om det är sannolikt att biokoncentrationsfaktorn (BCF) är oberoende av testkoncentrationen.
- En minimerad testutformning med exponering i vatten, där ett minskat antal provpunkter är möjliga om särskilda kriterier är uppfyllda.

⁽¹⁾ Se tillägg 1 för definitioner och enheter.

- Fiskens fetthalt bör mätas så att BCF kan uttryckas på grundval av 5 % fetthalt.
- Ökad betoning på kinetisk BCF-bestämning (när det är möjligt) förutom att uppskatta BCF i stabilt tillstånd.
- Test med exponering via föda kommer att föreslås för vissa grupper av ämnen där denna testmetod anses vara lämpligare än exponeringstest i vatten.
- Fiskens vikt bör mätas så att BCF_k kan korrigeras för utspädning på grund av tillväxt.

Innan man påbörjar något av bioackumuleringstesterna ska följande information om det undersökta ämnet finnas tillgänglig:

- (a) Analysteknikens känslighet för att mäta vävnader och vattenbaserade koncentrationer eller foderkoncentrationer för både testämnet och eventuella metaboliter (jfr punkt 65).
- (b) Löslighet i vatten [TM A.6, (2)]: detta bör bestämmas enligt en metod som är lämplig för (det uppskattade) löslighetsintervallet för att erhålla ett tillförlitligt värde. För hydrofoba ämnen brukar kolonnlueringsmetoden vara lämpligast.
- (c) Fördelningskoefficient oktanol/vatten, K_{ow} ⁽¹⁾ [testmetoderna A.8 (4), A.24 (5), A.23 (6)] eller annan lämplig information om fördelningsbeteende (t.ex. bindning till fett, K_{oc}). Detta bör bestämmas enligt en metod som är lämplig för (det uppskattade) intervallet för K_{ow} för att erhålla ett tillförlitligt värde. För hydrofoba ämnen brukar metoden med långsam omrörning vara lämpligast [TM A.23 (6)].
- (d) Ämnets stabilitet i vatten (hydrolysis [TM C.7 (7)]).
- (e) Ämnets stabilitet i foder (särskilt om ett test med exponering via föda väljs).
- (f) Information om fotolys i vatten som är relevant för testets bestrålningsbetingelser (8).
- (g) Ytspänning (dvs. för ämnen där $\log K_{ow}$ inte kan fastställas) [TM A.5 (9)].
- (h) Ångtryck [TM A.4 (10)].
- (i) Eventuell information om biotisk eller abiotisk nedbrytning i vatten, såsom (men inte begränsat till) biologisk nedbrytbarhet [TM C.4 delarna II–VII (11), C.29 (12)], i förekommande fall.
- (j) Information om metaboliter: struktur, $\log K_{ow}$, bildning och nedbrytbarhet, i förekommande fall.
- (k) Dissociationskonstant (pK_a) för ämnen som kan joniseras. Vid behov bör pH i testvattnet justeras för att se till att den joniserade formen av ämnet i testet är kompatibel med fiskarterna.

Oavsett vald exponeringsmetod eller provtagningssystem beskriver denna testmetod ett förfarande för karakterisering av ämnens bioackumuleringspotential i fisk. Även om genomflödesprov är att föredra, kan semistatiska metoder tillåtas, förutsatt att giltighetskriterierna (jfr punkterna 24 och 113) uppfylls. Vid exponering via föda är genomflödessystemet inte nödvändigt för att upprätthålla det testade ämnets vattenkoncentrationer, men bidrar till att upprätthålla lämpliga koncentrationer löst syre. Genomflödessystemet säkerställer också att vattnet är rent och att effekter av t.ex. avföringsprodukter elimineras.

⁽¹⁾ Benämns ibland P_{ow} ; bestäms genom en metod med skakning av kolv enligt TM A.8 (4), genom en HPLC-metod enligt TM A.24 (5) och genom en metod med långsam omrörning enligt TM A.23 (6). Ibland används generator-kolonn-tekniken för bestämning av $\log K_{ow}$. Det finns endast ett begränsat antal undersökningar som använder denna teknik, främst för klorerade bifenyl- och dibensodioxiner (t.ex. Li och Doucette, 1993) (3). För ämnen som kan joniseras bör $\log K_{ow}$ avse den joniserade formen.

Oavsett vilken testmetod som väljs ges tillräckliga upplysningar för genomförandet av provet i testmetoden, samtidigt som den ger lämplig frihet för experimentell utformning av förhållandena i vissa laboratorier och varierande karakteristik för de undersökta ämnena. Exponeringstestet via vatten används lämpligen för stabila organiska ämnen med $\log K_{ow}$ -värden mellan 1,5 och 6,0 (13), men kan även tillämpas på starka hydrofoba ämnen (med $\log K_{ow} > 6,0$) om en stabil och fullständigt upplöst koncentration av testämnet i vatten kan visas. Om en stabil koncentration av testämnet i vatten inte kan visas är en vattenstudie inte lämplig, och i sådana fall är exponering via föda ett bättre alternativ för att testa ämnet i fisk (tolkningen och användningen av resultat från exponeringstest via föda kan dock bero på tillämpligt regelverk). Förbedömningar av biokonzentrationsfaktorn (BCF, även benämnd K_b) för organiska ämnen med värden för $\log K_{ow}$ upp till ungefär 9,0 kan fås med den ekvation som tagits fram av Bintein m.fl. (14). Förbedömningen av biokonzentrationsfaktorn för sådana starkt hydrofoba ämnen kan vara högre än den biokonzentrationsfaktor vid stabilt tillstånd (BCF_{ss}) som kan förväntas fås vid laboratorieförsök, särskilt om en enkel linjär modell används för förbedömningen. Parametrar som karakteriserar bioackumuleringspotentialen är bland annat upptagningskonstanten (k_1), förlustkonstanter, inklusive utsöndringskonstanten (k_2), biokonzentrationsfaktorn vid stabilt tillstånd (BCF_{ss}), kinetisk biokonzentrationsfaktor (BCF_k) och biomagnifikationsfaktor för exponering via föda (BMF) ⁽¹⁾.

Radioaktiv märkning av de ämnen som ska undersökas kan underlätta analysen av vatten-, foder- och fiskprover och kan användas för att fastställa om identifiering och kvantifiering av metaboliter kommer att krävas. Om den totala radioaktiva resten mäts för sig (t.ex. genom förbränning eller vävnadsupplösning), grundas BCF eller BMF på totalvärdet för huvudblandningen, eventuella kvarvarande metaboliter och assimilerat kol. BCF- eller BMF-värden grundade på de totala radioaktiva resterna kan därför inte jämföras direkt med ett BCF eller BMF från specifika analyser av enbart huvudämnet. Separationsprocedurer som TLC, HPLC eller GC ⁽²⁾ kan användas före analys i undersökningar av radioaktivt märkta testämnen för att bestämma BCF eller BMF baserat på modersubstansen. Om separationstekniker tillämpas bör modersubstansen och relevanta metaboliter identifieras och kvantifieras ⁽³⁾ (jfr punkt 65) om BCF eller BMF ska baseras på huvudämnets koncentration i fisk och inte på totala rester av radioaktivt märkta testämnen. Det är också möjligt att kombinera en fiskmetabolismundersökning eller en undersökning av distribution in vivo med en bioackumuleringsundersökning genom analys och identifiering av vävnadsrester. Möjligheten till metabolism kan förutsägas med lämpliga verktyg (t.ex. OECD QSAR:s verktygslåda (15) och patentskyddade QSAR-program).

Beslutet om huruvida ett exponeringstest via vatten eller föda ska användas, och i vilken utformning, bör baseras på faktorerna i punkt 3 samt relevant regelverk. För ämnen som har hög $\log K_{ow}$ men fortfarande visar en uppskattbar vattenlöslighet i förhållande till känsligheten hos tillgängliga analystekniker bör t.ex. exponeringstest via vatten övervägas i första hand. Informationen om vattenlöslighet är dock inte alltid definitiv för dessa hydrofoba typer av ämnen, och därför bör man överväga möjligheten att bereda stabila mätbara upplösta vattenkoncentrationer (stabila emulsioner är inte tillåtna) för en undersökning av exponering via vatten innan man fattar beslut om vilken testmetod som ska användas (16). Det är inte möjligt att ge exakt föreskrivande vägledning om vilken metod som bör användas baserat på brytpunktskriterier för vattenlöslighet och fördelningskoefficienten oktanol/vatten, eftersom andra faktorer (analystekniker, nedbrytning, adsorption osv.) kan ha ett stort inflytande över metodens tillämplighet av de skäl som anges ovan. En $\log K_{ow}$ över 5 och en vattenlöslighet under ~0,01–0,1 mg/l är dock en indikation på vilken typ av ämnen som kan vara svårare att testa med exponering via vatten.

Andra faktorer som kan påverka valet av testmetod bör övervägas, bland annat ämnets adsorptionspotential i fråga om testkärn och apparater, ämnets stabilitet i vattenlösningar jämfört med stabiliteten i fiskfoder (17) (18), osv.

⁽¹⁾ Se tillägg 1 för definitioner och enheter.

⁽²⁾ TLC: tunnskiktskromatografi, HPLC: vätskekromatografi och GC: gaskromatografi.

⁽³⁾ Enligt vissa regelverk kan analysen av metaboliter vara obligatoriska om vissa villkor är uppfyllda (jfr punkt 65).

Information om sådana praktiska aspekter kan finnas i andra slutförda vattenundersökningar. Närmare information om utvärdering av aspekter kring utförandet av bioackumuleringsstudier finns i litteraturen (t.ex. (19)).

För ämnen vars upplösningsförmåga eller upprätthållandet av vattenkoncentrationen samt analysen av dessa koncentrationer inte hindrar genomförandet av en metod för exponering via vatten är denna metod att föredra för att bestämma ämnets biokoncentrationspotential. I alla händelser bör man kontrollera att de vattenexponeringskoncentrationer som ska användas håller sig inom testmediets upplösningsförmåga i vatten. Olika metoder för att upprätthålla stabila koncentrationer av det upplösta testämnet kan användas, såsom stamlösningar eller passiva doseringssystem (t.ex. kolonnulueringsmetoden), så länge som det kan visas att stabila koncentrationer kan upprätthållas och testmedierna inte ändras jämfört med det testmedium som rekommenderas i punkt 27.

Starkt hydrofoba ämnen ($\log K_{ow} > 5$ och en löslighet under $\sim 0,01-0,1$ mg/l) kan vara svårare att testa via vattenexponering. Orsaker till begränsningar kan vara att vattenkoncentrationen inte kan upprätthållas på en nivå som anses vara tillräckligt konstant (t.ex. på grund av sorption till glaset på exponeringskärl eller snabbt upptag hos fisken) eller att de vattenkoncentrationer som ska användas är så låga att de ligger inom samma intervall som eller under den analytiska kvantifieringsgränsen ⁽¹⁾. För dessa starkt hydrofoba ämnen rekommenderas test med exponering via föda, under förutsättning att testet överensstämmer med det tillämpliga regelverket och behov i samband med riskbedömningar.

För ytaktiva ämnen bör man överväga om biokoncentrationstestet är genomförbart med tanke på ämnets egenskaper. Annars är förmodligen test med exponering via föda lämpligare. Ytaktiva ämnen sänker gränssytningspänningen mellan två vätskor. Deras amfifila natur (dvs. de innehåller både en hydrofil och en hydrofob) får dem att ansamlas vid gränssytor, t.ex. gränssnittet mellan vatten och luft och mellan föder och vatten samt på glasväggar, vilket försvårar bestämningen av deras vattenkoncentration.

Genom test med exponering via föda kan man kringgå vissa av exponeringsaspekterna för komplexa blandningar som innehåller komponenter med olika vattenlöslighetsgränser, eftersom det är mer sannolikt att en jämförbar exponering för alla komponenter i blandningen uppnås i test med exponering via föda än med exponering via vatten(jfr (20)).

Det bör noteras att test med exponering via föda ger en biomagnifikationsfaktor (BMF), inte en biokoncentrationsfaktor (BCF) ⁽²⁾. Det finns metoder för att uppskatta en kinetisk biokoncentrationsfaktor (BCF_k) från de data som genereras i test med exponering via föda, vilket diskuteras i tillägg 8. Dessa metoder bör dock användas med försiktighet. Dessa metoder förutsätter i regel första ordningens kinetik och är endast tillämpliga på vissa grupper av föreningar. Det är osannolikt att sådana metoder kan användas för ytaktiva ämnen (se punkt 12).

Ett minimerat vattenexponeringstest med färre provtagningspunkter för att minska antalet djur och/eller resurser (se punkt 83 ff.) bör endast användas för dessa ämnen om det finns anledning att förutsätta att upptagningen och utsöndringen ungefär kommer att följa första ordningens kinetik (dvs. generellt icke-joniserade ämnen, jfr punkt 88).

⁽¹⁾ Uppmätta koncentrationer i vatten under upptagningsfasen bör helst vara över kvantifieringsgränsen så att mer än en halveringstid av kroppsbelastningen kan mätas i undersökningens utsöndringsfas.

⁽²⁾ Se tillägg 1 för definitioner och enheter.

C.13 – I: Test av biokoncentration i fisk vid exponering via vatten**TESTPRINCIP**

Testet består av två faser: exponeringsfasen (upptagningsfasen) och post-exponeringsfasen (utsöndringsfasen). Under upptagningsfasen exponeras en grupp av fiskar av en art för testämnet vid en eller flera valda koncentrationer beroende på testämnets egenskaper (jfr punkt 49). Fiskarna överförs därefter till ett medium fritt från det undersökta ämnet för utsöndringsfasen. Utsöndringsfas krävs alltid med mindre ämnesupptagningen under upptagningsfasen varit obetydlig. Koncentrationen av det undersökta ämnet i/på fisken eller specificerad vävnad därav ska följas under de bägge provningsfaserna. Utöver den exponerade gruppen ska en kontrollgrupp fiskar hållas under identiska förhållanden, förutom frånvaron av det undersökta ämnet, för att kunna jämföra eventuella negativa effekter i biokoncentrationsprovet mot en jämförbar kontrollgrupp och för att få bakgrundskoncentrationen av det undersökta ämnet ⁽¹⁾.

För vattenexponeringstestet brukar upptagningsfasen vara 28 dagar. Varaktigheten kan förlängas vid behov (jfr punkt 18) eller förkortas om det kan bevisas att stabilt tillstånd har uppnåtts tidigare (se tillägg 1, definitioner och enheter). Beräkning av upptagningsfasens längd fram till stabilitet kan göras med den ekvation som visas i tillägg 5. Utsöndringsperioden inleds när fisken inte längre exponeras för testämnet, genom överföring av fisken till samma medium, men utan det undersökta ämnet, i ett rent kärl. När så är möjligt ska biokoncentrationsfaktorn beräknas helst både som koncentrationsförhållandet i fisken (C_f) och i vattnet (C_w) vid stabilitet (BCF_{ss} , se definition tillägg 1) och som en kinetisk biokoncentrationsfaktor (BCF_k , se definitioner och enheter i tillägg 1) som uppskattas som förhållandet mellan upptagningskonstanten (k_1) och utsöndringskonstanten (k_2), varvid första ordningens kinetik ska förutsättas ⁽²⁾.

Om stabilt tillstånd inte uppnås inom 28 dagar beräknar man antingen BCF med hjälp av den kinetiska metoden (jfr punkt 38) eller förlänger upptagningsfasen. Om detta leder till en opraktiskt lång upptagningsfas för att nå stabilt tillstånd (jfr 37 och 38, tillägg 5) är den kinetiska metoden att föredra. Alternativt bör ett test med exponering via föda övervägas för starkt hydrofoba ämnen ⁽³⁾, under förutsättning att testet med exponering via föda överensstämmer med det tillämpliga regelverket.

Konstanten för upptagningshastigheten, konstanten för utsöndringshastigheten (eller konstanterna om mer komplexa modeller används), biokoncentrationsfaktorn (stabilt tillstånd och/eller kinetik) och när så är möjligt tillförlitlighetsgränserna för var och en av dessa parametrar beräknas med den modell som bäst beskriver den uppmätta koncentrationen av det undersökta ämnet i fisken och vattnet (jfr tillägg 5).

Ökningen av fiskmassa under testet kommer att leda till en minskning av testämnets koncentration i växande fisk (så kallad utspädning på grund av tillväxt), och den kinetiska BCF kommer att underskattas om den inte korrigeras för tillväxt (jfr punkterna 72 och 73).

BCF baseras på total koncentration i fisken (d.v.s. per fiskens totala våtvikt). I specialfall kan emellertid specificerade vävnader eller organ, som t.ex. muskler, lever osv. användas, om fisken är tillräckligt stor eller den kan delas upp i ätbara (filé) och icke ätbara (inälvor) delar. Eftersom det för många organiska ämnen föreligger ett klart samband mellan potentialen för biokoncentration och hydrofobicitet, finns det också ett motsvarande förhållande för fettinnehållet i den undersökta fisken och den observerade biokoncentrationen av sådana ämnen. För att minska denna källa till variationer i provningsresultaten för ämnen med hög fettupptagningsförmåga, dvs. med $\log K_{ow} > 3$, bör därför biokoncentrationen uttryckas som normaliserad för fisk med 5 % fetthalt (baserat på hela kroppsvåtvikten) förutom det värde som härleds direkt från undersökningen. Detta är nödvändigt för att skapa ett underlag för att jämföra resultat för olika ämnen och/eller testarter mot varandra. Siffran 5 % fetthalt är vedertagen, eftersom den motsvarar den genomsnittliga fetthalten för de fiskarter som vanligen används i denna testmetod (21).

⁽¹⁾ De flesta testämnen bör helst inte orsaka detektion i kontrollvattnet. Bakgrundskoncentrationerna bör endast vara relevanta för naturligt förekommande material (t.ex. vissa metaller) och ämnen som finns överallt i miljön.

⁽²⁾ Om det är uppenbart att första ordningens kinetik inte följs ska mer komplexa modeller tillämpas (se litteraturhänvisningar i tillägg 5) och råd inhämtas från biostatistiker.

⁽³⁾ Upptagningen kan begränsas av koncentrationer med låg exponering på grund av dålig upplösningsförmåga i vatten i biokoncentrationstestet, medan mycket högre exponeringskoncentrationer kan uppnås med kosttestet.

INFORMATION OM TESTÄMNET

Förutom de egenskaper hos testämnet som anges i inledningen (punkt 3) behövs information om toxiciteten för de fiskarter som ska användas i testet, företrädesvis asymptotisk LC_{50} (dvs. tidsberoende) och/eller toxicitet som uppskattats i långvariga fisktester (t.ex. TM C.47 (22), C.15 (23), C.14 (24)).

Det bör finnas tillgång till en lämplig analysmetod med känd noggrannhet, precision och känslighet för fastställande av mängden undersökt ämne i provlösningar och biologisk materia, tillsammans med uppgifter om beredning och förvaring av proverna. Den analytiska kvantifieringsgränsen för det undersökta ämnet ska också vara känd för både vatten och fiskvävnad. När radioaktivt märkta testämnen används ska de vara av högsta renhet (t.ex. företrädesvis > 98 %) och procentandelen radioaktivitet kopplad till föroreningar bör vara känd..

TESTETS GILTIGHET

För att ett test ska vara giltigt måste följande villkor uppfyllas:

Vattentemperaturvariationen ska vara mindre än ± 2 °C, eftersom stora avvikelser kan påverka de biologiska parametrar som är relevanta för upptagning och utsöndring och dessutom skapa stress hos djuren.

Koncentrationen löst syre får inte falla under en mättnad på 60 %.

Koncentrationen av det undersökta ämnet i kärnen ska hållas inom ± 20 % av det medelvärde som mäts under upptagningsfasen.

Koncentrationen av testämnet ska vara lägre än dess löslighet i vatten, eftersom testvattnet påverka ämnet så att det inte löses upp ordentligt ⁽¹⁾.

Dödligheten eller andra negativa effekter/sjukdomar i både kontroll- och behandlingsgrupperna ska vara mindre än 10 % vid slutet av testet. Om testet förlängs över flera veckor eller månader ska dödligheten eller andra negativa effekter i bägge fiskgrupperna vara mindre än 5 % per månad och får inte överstiga 30 % totalt. Signifikanta skillnader i den genomsnittliga tillväxten mellan test- och kontrollgrupperna kan vara en indikation på testämnets toxiska effekt.

REFERENSÄMNEN

Användning av referensblandningar med känd biokoncentrationspotential och låg metabolism kan vara lämpligt vid kontroll av experimentförloppet när så krävs (t.ex. om laboratoriet inte har tidigare erfarenhet av testet eller försöksbetingelserna har ändrats).

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Utrustning

Material som kan lösas upp, absorberas eller läcka och som har negativ effekt på fisken ska nogsamt undvikas i alla delar av utrustningen. Vanliga rektangulära eller cylindriska tankar, tillverkade av kemiskt beständigt material och med lämplig kapacitet vad gäller fyllningshastigheten (jfr punkt 43) kan användas. Användning av mjuka plaströr bör minimeras. Polytetrafluoretylen, rostfritt stål och/eller glasrör bör användas. Erfarenheter visar att kiselglas kan krävas för testämnen med hög absorptionskoefficient, som t.ex. syntetiska pyretroider. I dessa fall bör utrustningen kasseras efter användningen. Testsystemen bör exponeras för koncentrationer av det testämne som ska användas i undersökningen under så lång tid som krävs för att visa att stabila exponeringskoncentrationer kan upprätthållas innan testorganismerna inbegrips.

⁽¹⁾ För multikomponentämnen, UVCB och blandningar bör vattenlösligheten för varje relevant komponent övervägas för att avgöra lämpliga exponeringskoncentrationer.

Vatten

Naturligt vatten används vanligtvis vid undersökningen och bör tas från en oförorenad källa med jämn kvalitet. Rekonstituerat vatten (dvs. avmineraliserat vatten med specifika näringsämnen tillsatta i kända mängder) kan dock vara lämpligare för att säkerställa enhetlig kvalitet över tiden. Lösningssvattnet, som är det vatten som blandas med testämnet innan det hålls in i testkärlet (jfr punkt 30) måste hålla en kvalitet som möjliggör överlevnad för valda fiskarter under aklimatiserings- och provningsperioderna, utan att fiskarna uppvisar onormala förändringar eller beteende. I idealfallet ska det kunna visas att de arter som används kan överleva, växa och reproducera sig i vattenlösningen, t.ex. vid laboratorieodling eller en giftundersökning under livscykeln. Spädsvattnet ska bestämmas avseende pH, hårdhet, partikelförekomst, total mängd organiskt kol (TOC ⁽¹⁾) och helst även ammonium, nitrit och alkalitet, samt för havslevande arter även salthalt. De parametrar som är viktiga för fiskens optimala välbefinnande är inte fullt kända, men i tillägg 2 anges rekommenderade maximala koncentrationer för ett antal parametrar för sötvatten- och havsvattenprover.

Utspädningssvattnet ska hålla jämn kvalitet under hela testet. pH-värdet ska ligga mellan 6,0 och 8,5 vid teststarten, men under pågående provning ska det ligga inom $\pm 0,5$ enheter. För att säkerställa att vattnet inte påverkar undersökningsresultatet på önskat sätt, t.ex. genom förändring av det undersökta ämnet, eller negativt påverkar fiskbeståndets förutsättningar, ska prover tas med jämna mellanrum för analys, åtminstone i början och slutet av testet. Bestämning av tungmetaller (t.ex. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd och Ni), viktiga anjoner och kationer (t.ex. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- och SO_4^{2-}), bekämpningsmedel (t.ex. total mängd organiska fosforföreningar eller total mängd organiska klorföreningar), halten organiskt kol och uppslammade partiklar bör utföras t.ex. var tredje månad i fall där man vet att utspädningssvattnet håller en relativt jämn kvalitet. Om utspädningssvattnets kvalitet har visat sig vara jämn under minst ett år kan dessa kontroller göras med längre intervaller (t.ex. var sjätte månad).

Den naturliga partikelinnehållet samt den totala mängden organiskt kol i vattenlösningen ska vara så låg som möjligt för undvikande av adsorption av det undersökta ämnet i organisk materia, vilket skulle kunna minska dess biotillgänglighet och leda till en underskattning av BCF. Det maximalt acceptabla värdet är 5 mg/l för partiklar (torr materia som inte passerar ett filter på 0,45 μm) och 2 mg/l för helorganiskt kol (jfr tillägg 2). Utspädningssvattnet ska vid behov filtreras före användning. Bidraget till innehållet av organiskt kol i testvattnet (exkrementer) från fisk och foderrester ska vara så litet som möjligt. Koncentrationen av organiskt kol i vattnet (exkrementer) från fisk och foderrester ska vara så litet som möjligt (jfr punkt 46).

Testlösningar

Lös upp det undersökta ämnet vid lämplig koncentration för förvaring. Stamlösningen ska helst beredas genom att det undersökta ämnet helt enkelt blandas eller rörs i vattenlösningen. Ett alternativ som kan vara lämpligt i vissa fall är att använda ett doseringssystem med fast fasdesorption. Användningen av lösningsmedel och dispergeringsmedel (lösningsagenter) rekommenderas generellt inte (jfr. (25)), men kan vara godtagbar för att producera en lämpligt koncentrerad stamlösning. Användningen bör dock minimeras så mycket som möjligt, och materialens kritiska micellkoncentration får inte överskridas (i förekommande fall). Lösningssmedel som får användas är etanol, metanol, dimetylformamid och trietylenglykol. Dispergeringsmedel som har använts är Tween 80, metylcellulosa 0,01 % och HCO-40. Lösningssmedelskoncentrationen i det slutliga testmediet bör vara densamma i alla behandlingar (dvs. oavsett testämnets koncentration) och får inte överstiga de motsvarande toxicitetsgränser som fastställts för lösningsmedlet enligt försöksbetingelserna. Högsta nivån är en koncentration på 100 mg/l (eller 0,1 ml/l). Det är osannolikt att en lösningsmedelskoncentration på 100 mg/l kommer att ändra den högsta upplösta koncentrationen av testämnet som kan uppnås i mediet i någon större utsträckning (25). Lösningssmedlets bidrag (tillsammans med testämnet) till det totala innehållet av organiskt kol i provningssvattnet ska vara känt. Koncentrationen av totalt organiskt kol i provningskärlet ska under undersökningen inte överstiga den koncentration av organiskt kol som härrör från testämnet, lösningsmedlet eller lösningsagenten ⁽²⁾ om sådan används, med mer än 10 mg/l (± 20 %). Det organiska innehållet kan ha en betydande effekt på mängden fritt

⁽¹⁾ TOC inkluderar organiskt kol från partiklar och löst organiskt kol, dvs. TOC = POC + DOC.

⁽²⁾ Om ett lösningsmedel eller ett solubiliseringsmedel används bör det organiska kol som härrör från agenten läggas till det organiska kolet i testämnet för att bedöma koncentrationen av organiskt kol i testkärnen, men detta rekommenderas inte generellt.

upplöst testämne under genomflödestest för fisk, särskilt för ämnen med hög fetthalt. Mikroextraktion i fast fas (jfr punkt 60) kan ge viktig information om förhållandet mellan bundna och fritt upplösta föreningar, varav de senare förutsätts utgöra den biotillgängliga fraktionen. Testämneskoncentrationen bör vara lägre än testämnets löslighetsgräns i testmediet, oavsett användning av lösningsmedel eller solubiliseringsmedel. Försiktighet ska iakttas vid användning av lätt biologiskt nedbrytbara lösningsmedel, eftersom dessa kan förorsaka problem med bakterietillväxt vid genomflödesprovning. Om det inte är möjligt att bereda stamlösningen utan solubiliseringsmedel bör man överväga om vattenexponering är ett lämpligt val eller om ett test med exponering via föda skulle vara lämpligare.

Vid genomflödesprovet krävs ett system som kontinuerligt släpper ut och löser upp stamlösningen av det undersökta ämnet (t.ex. med mätpump, proportionalitetslösningssystem eller ett doseringssystem med fast fasdesorption) för att leverera provningskoncentrationerna till provningskärlen. Helst ska minst fem volymsombyten per dag göras i provningskärlen. Genomflödessystemet är att föredra, men när detta inte är genomförbart, t.ex. om den undersökta organismen påverkas negativt därav, kan en semistatisk teknik användas, förutsatt att giltighetskriterierna uppfylls (jfr punkt 24). Stamlösningens och utspädningsvattnets flöden ska kontrolleras både 48 timmar före och minst en gång dagligen under pågående provning. Denna kontroll ska omfatta fastställande av flödes hastigheten genom varje provningskammare, samt skall den garantera att flödes hastigheten inte varierar med mer än 20 % inom eller mellan kärlen.

Val av art

Viktiga kriterier vid val av arter är att de ska finnas enkelt tillgängliga, kan skaffas i lämpliga storlekar och kan hållas på ett tillfredsställande sätt i laboratoriemiljö. Andra kriterier vid val av fiskart är betydelsen för rekreation, handel och ekologi samt jämförbar känslighet, tidigare framgångsrik användning osv. Rekommenderade testarter anges i tillägg 3. Andra arter kan användas, men provningsförfarandet kan då behöva anpassas för att ge lämpliga provningsförhållanden. I ett sådant fall måste testrapporten innehålla en motivering för valet av art och testmetod. Användning av mindre fiskarter förkortar vanligen tiden fram till stabilt tillstånd, men det kan behövas mer fisk (prover) för en lämplig analys av fetthalten och koncentrationen av testämnet i fisken. Dessutom kan skillnader i andningstakt och metabolism mellan äldre och yngre fiskar försvåra jämförelser av resultaten mellan olika tester och testarter. Det bör noteras att fiskarter som testas under ett stadium med snabb tillväxt (ungfisk) även kan försvåra datatolkningen.

Fiskhållning (relevant för exponering via vatten och föda)

Fiskbeståndet bör akklimatiseras under minst två veckor i vatten (jfr punkt 28) med provningstemperaturen och hela tiden utfodras med tillräckligt foder (jfr punkt 45). Både vatten och foder bör vara av samma typ som de som ska användas under testet.

Efter en anpassningsperiod på 48 timmar ska dödligheten registreras och följande kriterier tillämpas:

- Om mortaliteten under sju dagar är högre än 10 % av beståndet bör hela beståndet förkastas.
- Om mortaliteten ligger mellan 5 % och 10 % av beståndet under sju dagar: fortsatt akklimatiseringen under ytterligare sju dagar. Om mer än 5 % av beståndet har dött under den andra sjudagarsperioden ska hela beståndet förkastas.
- Om mortaliteten under sju dagar är lägre än 5 % av beståndet kan beståndet godtas.

Fisk som används vid undersökningen bör inte ha några synliga sjukdomar eller abnormiteter. Alla döda fiskar rensas bort. Fiskarna bör inte ges behandling mot sjukdomar under de två veckorna före testet eller under testets gång.

TESTFÖRFARANDE

Preliminärt test

Det kan vara lämpligt att göra ett preliminärt försök för att optimera provningsförhållandena för det slutgiltiga testet, t.ex. val av koncentration för det undersökta ämnet och längd på upptagnings- och utsöndringsfaserna, eller för att fastställa om ett fullständigt test måste utföras. Det preliminära testet bör utformas så att det är möjligt att inhämta den information som krävs. Man bör överväga om ett minimerat test är tillräckligt för att härleda BCV eller om det krävs en fullständig undersökning (jfr punkterna 83–95 om minimerade test).

Exponeringsförhållanden*Upptagningsfasens längd*

Upptagningsfasens längd kan bedömas utifrån praktiska erfarenheter (t.ex. från tidigare undersökning eller en ackumuleringsstudie av en strukturellt relaterad kemikalie) eller från vissa empiriska förhållanden tillsammans med kunskap om antingen testämnets vattenlöslighet eller fördelningskoefficient oktanol/vatten (under förutsättning att upptagningen följer första ordningens kinetik (jfr tillägg 5)).

Upptagningsfasen ska vara 28 dagar om det inte kan visas att stabilt tillstånd nås tidigare (se tillägg 1, definitioner och enheter). Stabilt tillstånd nås när mängden undersökt ämne i fisk (C_f) i den tidpunkt där kurvan blir parallell med tidsaxeln och tre på varandra följande C_f -analyser, på prover tagna med intervaller på minst två dagar, ligger inom $\pm 20\%$ på de tre proverna och ingen signifikant ökning av C_f förekommer under tiden mellan den första och den sista successiva analysen. När kombinerade prover analyseras krävs minst fyra på varandra följande analyser. När de undersökta ämnena tas upp långsamt bör provtagningsintervallerna vara sju dagar. Om stabilt tillstånd inte har nåtts efter 28 dagar kan man antingen beräkna BCF endast med den kinetiska metoden, som inte är beroende av huruvida stabilt tillstånd har nåtts, eller förlänga upptagningsfasen och göra ytterligare mätningar till dess stabilt tillstånd nås eller i 60 dagar, beroende av vad som inträffar först. Testämnets koncentration i fisken vid slutet av upptagningsfasen måste också vara tillräckligt hög för att möjliggöra en tillförlitlig uppskattning av k_2 från utsöndringsfasen. Om ingen betydande upptag visas efter 28 dagar kan testet avbrytas.

Utsöndringsfasens varaktighet

För ämne som följer första ordningens kinetik är en period motsvarande halva upptagningsfasen normalt tillräcklig för att få tillräcklig minskning, t.ex. 95 %, av det undersökta ämnet i fiskkroppen (jfr tillägg 5 för förklaring av bedömningen). Om den tid som krävs för att få en 95-procentig minskning blir orimligt lång, dvs. att den överskrider dubbla normala varaktigheten för upptagningsfasen, dvs. mer än 56 dagar, kan en kortare period användas, t.ex. tills koncentrationen av det undersökta ämnet är mindre än 10 % av koncentrationen vid stabilitet. Längre utsöndringsperioder kan dock krävas för ämnen med ett mer komplext mönster för upptagning och utsöndring än det som representeras av en enstaka fiskmodell med första ordningens kinetik. Om sådana komplexa mönster observeras och/eller förväntas bör man dock inhämta råd från biostatistiker och/eller farmakokinetiker för att säkerställa en lämplig testutformning. Eftersom utsöndringsperioden förlängs kan antalet provfiskar begränsas och tillväxtskillnader mellan fisken kan påverka resultaten. Periodens längd kommer även att styras utifrån längden på den period under vilken koncentrationen av testämnet i fiskarna ligger kvar över en analytisk kvantifieringsgräns.

Antal testfiskar

Välj antalet fiskar per undersökt koncentration på ett sådant sätt att minst fyra fiskar finns tillgängliga vid varje provtagningspunkt. Fiskgrupper bör endast slås ihop om det inte är möjligt att analysera enstaka fiskar. Om man vill ha högre precision i kurvanpassning (och härledda parametrar) eller om metabolismundersökningar är nödvändiga (t.ex. för att skilja mellan metaboliter och modersubstanser vid användning av radioaktivt märkta testämnen) behövs fler fiskar per provtagningspunkt. Fettinnehållet ska fastställas för samma biologiska materia som används för fastställande av koncentrationen av testämnet. Om detta inte är möjligt kan fler fiskar behövas (jfr punkterna 56 och 57).

Om vuxna (dvs. könsmogna) fiskar används bör de inte leka eller nyligen ha lekt, varken före eller under testet. Det ska också redovisas om han- eller honfiskar eller bägge används i försöket. Om båda könen används ska det dokumenteras att skillnader i tillväxt och fetthalt mellan könen är inte är signifikanta innan exponeringen inleds, särskilt om det kan bli nödvändigt att slå ihop han- och honfiskar för att säkerställa detekterbara ämneskoncentrationer och/eller fetthalter.

Vid denna typ av undersökningar ska fiskar med jämn vikt alltid väljas på ett sådant sätt att den minsta fisken inte väger mindre än 2/3 av vad den största väger. Samtliga fiskar ska vara från samma årskull och från samma källa. Eftersom fiskens vikt och ålder kan ha stor betydelse för BCF-värdena (12), bör dessa uppgifter registreras korrekt. Det rekommenderas att delar av fiskbeståndet vägs kort före det att testet inleds för att fastställa medelvikten (jfr punkt 61).

Fisktäthet

En hög fisktäthet bör användas för att minimera minskningen av koncentrationen av testföreningen i vatten på grund av tillförsel av fiskar vid undersökningens början samt för att undvika en ökning av koncentrationen löst syre. Det är viktigt att fisktätheten är anpassad för den art som används. En täthet på 0,1–1,0 g fisk (våt vikt) per liter vatten och dag rekommenderas normalt. Högre fisktäthet per liter vatten kan användas om det visar sig att önskad koncentration av det undersökta ämnet kan upprätthållas inom $\pm 20\%$ och att koncentrationen löst syre inte faller under 60 % mättnad (jfr punkt 24).

Vid val av lämpliga system ska hänsyn tas till fiskartens normala beteende. Bottenlevande fisk kan således kräva en större bottenyta i ett akvarium för en viss vattenvolym jämfört med ytlevande fiskarter.

Utfodring

Under aklimatiserings- och provningsperioderna ska fisken utfodras med lämplig diet med känd fetthalt och totalt proteininnehåll, i sådan utsträckning att de hålls friska och behåller kroppsvikten (en viss tillväxt är tillåten). Under aklimatiserings- och provningsperioderna bör man utfodra fisken dagligen vid en fast nivå beroende på använda arter, försöksbetingelser och fodrets kalorivärde (för regnbåge t.ex. omkring 1–2 % av kroppsvikten per dag). Foderintervallerna bör väljas så att snabb tillväxt och stora ökningar av fetthalten undviks. För att upprätthålla samma foderintervall bör fodermängden omräknas med lämpliga mellanrum, t.ex. en gång i veckan. Vid denna beräkning kan fiskens vikt i respektive provningskammare bedömas utifrån vikten på den fisk som senast tagits som prov från respektive kammare. Väg inte den fisk som lämnas kvar i kammaren.

Kvarvarande foder och exkrementer bör sugas ut från provningskammaren kort efter utfodringen (30 minuter till 1 timme). Kärlen bör hållas så rena som möjligt under testet så att koncentrationen av organiskt material hålls så låg som möjligt (jfr punkt 29), eftersom förekomst av organiskt kol kan begränsa testämnets biotillgänglighet (12).

Eftersom många fodersorter baseras på fiskmjöl bör man se till att fodret inte påverkar testresultaten eller inducerar negativa effekter, t.ex. om de innehåller (spår av) bekämpningsmedel, tungmetaller och/eller själva testämnet.

Ljus och temperatur

Rekommenderad ljusperiod är 12 till 16 timmar, och temperaturen ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) ska vara anpassad för testarten (jfr tillägg 3). Belysningens typ och egenskaper ska vara kända. Hänsyn ska tas till det undersökta ämnets eventuella fototransformation under strålningsförhållanden vid försöket. Lämplig belysning ska användas för undvikande av exponering av fisken för onaturliga ljusprodukter. Det kan i vissa fall vara lämpligt att använda ett filter för bortfiltrering av UV-strålning under 290 nm.

Testkoncentrationer

Testet utformades ursprungligen för icke-polära organiska ämnen. För denna typ av ämne kan det vara tillräckligt att exponera fisken för en enda koncentration, eftersom inga koncentrationseffekter förväntas. Dock kan två koncentrationer krävas enligt tillämpligt regelverk. Om ämnen utanför detta område testas eller om det finns andra indikationer på eventuellt koncentrationsberoende, bör testet köras med två eller flera koncentrationer. Om bara en koncentration testas bör detta motiveras (jfr punkt 79). Dessutom bör den testade koncentrationen vara så låg som är praktiskt eller tekniskt möjligt (dvs. inte nära löslighetsgränsen).

I vissa fall kan det förväntas att biokoncentrationen av ett ämne är beroende av vattenkoncentrationen (t.ex. för metaller, där upptagning i fisk kan vara åtminstone delvis reglerat). I ett sådant fall måste minst två, men helst fler, miljömässigt relevanta koncentrationer testas (jfr punkt 49). Av praktiska skäl rekommenderas testning vid minst två koncentrationer även för ämnen där de testade koncentrationerna måste vara nära löslighetsgränsen, eftersom detta kan ge insikt i exponeringskoncentrationernas tillförlitlighet. Vid valet av testkoncentrationer bör man beakta den miljömässigt realistiska koncentrationen samt den koncentration som är relevant för syftet med bedömningen.

Koncentrationen eller koncentrationerna av testämnet bör väljas under kronisk effekt eller till ungefär 1 % av dess akuta asymptotiska LC_{50} inom ett miljömässigt relevant intervall och så att den är åtminstone högre än den kvantifieringsgräns som ska överskridas i vatten med den använda analysmetoden. Den högsta tillåtliga provningsskoncentrationen kan också fastställas genom division av den akuta LC_{50} under 96 timmar med lämpligt akut/kronisk kvot (lämpliga kvoter för vissa kemikalier är t.ex. omkring 3, men ett fåtal kemikalier är över 100). Om en andra koncentration används bör den avvika från den ovannämnda koncentrationen med en faktor på 10. Om detta inte är möjligt på grund av toxicitetskravet (som begränsar den övre testkoncentrationen) och analysgränsen (som begränsar den lägre testkoncentrationen) kan en lägre faktor än 10 tillämpas och användning av radioaktivt märkta testämnen (av högsta renhet, helst > 98 %) bör övervägas. Det är viktigt att se till att ingen av de använda koncentrationerna ligger över testämnets löslighetsgräns i testmediet.

Kontroller

En utspädningsvattenkontroll eller i förekommande fall (jfr punkterna 30 och 31), en kontroll som innehåller lösningsmedlet ska göras förutom testserierna.

Frekvens för mätningar av vattenkvaliteten

Löst syre, TOC, pH och temperatur ska mätas i samtliga test- och kontrollkärl under testet. Total hårdhet och salthalt (om relevant) bör mätas i kontrollerna och i ett kärl. Om två eller fler koncentrationer testas mäts dessa parametrar vid den högre (eller högsta) koncentrationen. Löst syre och eventuellt salthalt ska mätas minst tre gånger – i början, ungefär i mitten och mot slutet av upptagningsperioden – och en gång i veckan under utsöndringsperioden. TOC ska mätas vid början av provet (24 och 48 timmar innan upptagningsfasen initieras) före det att fisken tillsätts och minst en gång i veckan under både upptagnings- och utsöndringsfaserna. Temperaturen ska mätas och registreras dagligen, pH i början och slutet av varje period och hårdheten en gång under varje provning. Temperaturen ska helst avläsas kontinuerligt i åtminstone ett kärl.

Provtagning och analys av fisk och vatten

Schema för provtagning på fisk och vatten

Prover av vatten från provningskärlen ska tas både före det att fisken tillsätts samt under upptagnings- och utsöndringsfaserna för fastställande av koncentrationen av testämnet. Prover bör tas av vattnet före utfodring, samtidigt som provtagningen av fisken. Tätare provtagningsintervaller kan vara lämpliga för att säkerställa stabila koncentrationer efter tillförseln av fisken. Under upptagningsfasen bör koncentrationen av det undersökta ämnet fastställas för kontroll av överensstämmelse med giltighetskriterierna (punkt 24). Om vattenprovsanalyserna i början av utsöndringsfasen visar att testämnet inte detekteras, kan det vara motiverat att inte mäta test- och kontrollvattnet för testämnet under återstoden av utsöndringsfasen.

Prover bör tas på fisken minst fem gånger under upptagningsfasen och vid minst fyra tillfällen under testämnets utsöndringsfas. Eftersom det i bland är svårt att göra en exakt uppskattning av BCF-värdet grundat på detta antal prover (framför allt när en annan upptagning och utsöndringskinetik än första ordningens kan påvisas), kan det vara tillrådligt att ta prover med tätare mellanrum under bägge perioderna (jfr tillägg 4).

Fettinnehållet ska fastställas för samma biologiska materia som används för fastställande av koncentrationen av testämnet åtminstone i början och slutet av upptagningsfasen och i slutet av utsöndringsfasen. Om detta inte är möjligt bör prover tas på minst tre oberoende fiskar för att fastställa fetthalten vid var och en av de tre tidpunkterna. Fiskantalet per tank i början av försöket bör justeras därefter ⁽¹⁾. Om inga signifikanta mängder av testämnet detekteras i kontrollfisken (dvs. från stampopulationen) kan kontrollfisken från testet analyseras endast för fetthalt, och testämneshalten i testgrupperna (samt relaterade upptagnings- och utsöndringskonstanter samt BCF-färden) kan korrigeras för ändringar enligt kontrollgruppens fetthalt under testet ⁽²⁾.

Analys av testämnet och fetthalt ska inte göras av döda eller sjuka fiskar.

I tillägg 4 ges ett exempel på ett acceptabelt provtagningsschema. Andra scheman kan lätt räknas ut med andra antagna värden för K_{ow} för beräkning av exponeringstiden för att få 95-procentig upptagning (se tillägg 5 för beräkningar).

Provtagningen ska fortsätta under upptagningsfasen tills stabilt tillstånd har uppnåtts (se tillägg 1, definitioner och enheter) eller tills upptagningsfasen har avslutats (efter 28 eller 60 dagar, jfr punkterna 37 och 38). Innan utsöndringsfasen inleds bör fisken flyttas över till rena kärl.

Provtagning och provberedning

Vattenprover bör tas för analys, t.ex. genom en tät röranslutning i provningskammarens mittpunkt. Den icke-biotillgängliga fraktionen av testämnet kan inte alltid separeras från den biotillgängliga fraktionen genom centrifugering eller filtrering. Om en separationsteknik används ska en motivering till eller validering av tekniken alltid anges i testrapporten på grund av svårigheterna med biotillgänglighet (25). Särskilt när det gäller hydrofoba ämnen (ämnen med $\log K_{ow} > 5$) (12) (26), där adsorption till filtermatrisen eller centrifugeringskärlen kan förekomma, bör proverna inte genomgå sådana behandlingar. Åtgärder bör i stället vidtas för att hålla tankarna så rena som möjligt (jfr punkt 46) och innehållet fullorganiskt kol ska övervakas under både upptagnings- och utsöndringsfasen (jfr punkt 53). För att undvika eventuella problem med minskad biotillgänglighet kan provtagning med mikroextraktion i fast fas tillämpas för svårslösliga och mycket hydrofoba ämnen.

⁽¹⁾ Om fetthalten inte analyseras hos samma fiskar som testämnet bör fisken åtminstone vara av liknande vikt och (i förekommande fall) kön.

⁽²⁾ Detta alternativ får endast användas om antalet fiskar i alla testgrupper är ungefär lika och fisken avlägsnas enligt samma mönster och utfodras på samma sätt. Detta säkerställer att fiskens tillväxt i alla testgrupper är liknande, om den testade koncentrationen ligger under toxicitetsintervallet. Om tillväxten är liknande förväntas även fetthalten vara liknande. En annorlunda tillväxt i kontrollgruppen skulle visa på en ämneseffekt och då blir undersökningen ogiltig.

Provtagningsfisken bör avlivas omedelbart med en lämplig och human metod (för hela fiskmätningar bör inga andra processer än sköljning med vatten (jfr punkt 28) och torr torkning av fisken utföras). Väg fisken och mät den totala längden ⁽¹⁾. Uppmätt vikt och längd för varje enskild fisk kopplas till den analyserade ämneskoncentrationen (och fetthalten i förekommande fall), t.ex. genom användning av en unik identifieringskod för varje fisk.

Det är lämpligt att under den tid som provet pågår analysera fisken och vattnet omedelbart efter provtagning, för att förhindra försämring eller andra förluster samt för beräkning av ungefärlig upptagnings- och utsöndringshastighetskonstanter. Mellanalyser förhindrar också förseningar när det gäller fastställandet av när platån (stabilt tillstånd) har uppnåtts.

Om mellananalyser inte görs ska proverna förvaras med en lämplig metod. Innan undersökningen påbörjas bör man inhämta information om lämplig förvaringsmetod för det aktuella ämnet, t.ex. djupfrysning, nedkylning vid 4 °C, extraktion osv. Lagringsperioden bör väljas så att ämnet inte försämras under lagringen.

Analysmetodens kvalitet

Eftersom hela proceduren i huvudsak styrs av noggrannhet, precision och känslighet i den analysmetod som används för det undersökta ämnet, ska noggrannhet, precision och reproducerbarhet för ämnesanalysen kontrolleras experimentellt, vilket även gäller för återhämtning av det undersökta ämnet från både vatten och fisk, vilket ska vara tillfredsställande med den aktuella metoden. Detta bör ingå i de preliminära testerna. Kontrollera också att det undersökta ämnet inte kan upptäckas i det utspädningsvattnet som används. Vid behov bör de värden för testämneskoncentrationen i vatten och fisk som erhållits från testet korrigeras för återhämtning och bakgrundsvärden i kontrollerna. Fisk- och vattenprover bör alltigenom hanteras på ett sådant sätt att förorening och förlust minimeras, t.ex. på grund av adsorption från provtagningsanordningarna.

Analys av fiskprov

Om radioaktivt märkt material används vid undersökningen är det möjligt att analysera den totala radioaktiva märkningen, dvs. moderblandning och metaboliter, eller kan proverna rengöras så att moderämnet kan analyseras separat. Om BCF ska baseras på modersubstansen bör de större metaboliterna karakteriseras, som ett minimum i slutet av upptagningsfasen (jfr punkt 6). Större metaboliter är metaboliter som utgör ≥ 10 % av de totala resterna i fiskvävnaden, metaboliter som utgör ≥ 5 % vid två provtagningspunkter i rad, metaboliter som visar ökande nivåer under upptagningsfasen och metaboliter med känd toxikologisk risk. Om BCF för hela fisken räknat i totala radioaktivt märkta rester är ≥ 500 kan det vara tillrådligt att identifiera och kvantifiera större metaboliter. För vissa kategorier av ämnen som bekämpningsmedel rekommenderas det starkt. Kvantifiering av sådana metaboliter kan vara ett krav från vissa tillsynsmyndigheter. Om rester som representerar ≥ 10 % av den totala radioaktivt märkta resten i fiskvävnaden identifieras och kvantifieras, är det också rekommendabelt att identifiera och mängdbestämma resterna i provningsvattnet. Om detta inte är möjligt ska en förklaring lämnas i rapporten.

Koncentrationen av det undersökta ämnet ska normalt fastställas för varje vägd fiskindivid. Om detta inte är möjligt kan man slå ihop proven för varje provtagningsstillfälle. Sammanslagning begränsar dock urvalet av statistiska metoder för uppgifterna och därför bör testet i sådana fall omfatta tillräckligt många fiskar för att tillgodose behoven i fråga om sammanslagning, statistisk metod och statistisk kraft. Litteraturhänvisningarna (27) och (28) kan användas som en introduktion till relevanta sammanslagningsprocedurer.

⁽¹⁾ Förutom vikt bör totallängd registreras, eftersom jämförelser av längdökningar under testperioden är en bra indikator på huruvida en negativ effekt har uppstått.

BCF bör uttryckas som normaliserat för fisk med en fetthalt på 5 % (baserat på våtvikt), förutom den fetthalt som härletts direkt från undersökningen (jfr punkt 21), om det inte kan hävdas att testämnet inte primärt ackumuleras i lipider. Fiskens fetthalt ska om möjligt bestämmas vid varje provtagningstillfälle, helst på samma extrakt som det som tagits fram för analys av det undersökta ämnet, eftersom fett ofta måste tas bort från extraktet innan kromatografisk analys kan göras. Analysen av testämnena kräver dock ofta specifika extraktionsprocedurer som kan strida mot testmetoderna för bestämning av fetthalt. I ett sådant fall (fram till dess att icke-destruktiva instrumentmetoder finns tillgängliga) bör en annan strategi tillämpas för bestämning av fetthalten (jfr punkt 56). Lämpliga metoder ska användas för fastställandet av fettinnehållet (20). Kloroform-/metanolextraktionstekniken (29) kan rekommenderas som standardmetod (30), men Smedes-metoden (31) rekommenderas som en alternativ teknik. Smedes-metodens effektivitet är jämförbar vad gäller extraktionsförmåga, den har hög noggrannhet, använder mindre toxiska lösningsmedel och är lättanvänd. Andra metoder vars noggrannhet kan jämföras med de rekommenderade metoderna kan användas med vederbörlig motivering. Det är viktigt att lämna uppgifter om den metod som använts.

Mätning av fiskens tillväxt

När testet inleds vägs fem till tio enskilda fiskar från stampopulationen och deras totallängd mäts. Man kan använda samma fisk som för fettanalysen (jfr punkt 56). Vid varje provtagningstillfälle ska använd fisk från både test- och kontrollgrupperna vägas och mätas innan den kemiska analysen eller fettanalysen utförs. Mätningarna av dessa provtagningsfiskar kan användas för att uppskatta vikt och längd för den fisk som är kvar i testet och kontrolltankarna (jfr punkt 45).

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

Upptagningskurvan för det undersökta ämnet bör fås genom avsättning av dess koncentration i/på fisk (eller specificerad vävnad därav) under upptagningsfasen i förhållande till tiden på aritmetisk skala. Om kurvan når en plåtå, dvs. blir ungefär asymptotisk med tidsaxeln, beräknas BCF för stabilt tillstånd (BCF_{ss}) med följande formel:

$$\frac{C_f \text{ vid stabilt tillstånd (medelvärde)}}{C_w \text{ vid stabilt tillstånd (medelvärde)}}$$

Utvecklingen av C_f kan påverkas av fiskens tillväxt (jfr punkterna 72 och 73). Medelvärdet för exponeringskoncentrationen (C_w) påverkas av variationer över tiden. Det kan förväntas att en tidsviktad genomsnittlig koncentration är mer relevant och precis för bioackumuleringsundersökningar, även om variationen håller sig inom ett lämpligt validitetsintervall (jfr punkt 24). Ett tidsviktat genomsnitt (TWA) för vattenkoncentrationen kan beräknas enligt tillägg 5, avsnitt 1.

Den kinetiska biokoncentrationsfaktorn (BCF_k) ska bestämmas som förhållandet k_1/k_2 , de två hastighetskonstanterna enligt den första ordningens kinetik. Konstanterna k_1 och k_2 samt BCF_k kan härledas genom samtidiga upptagnings- och utsöndringsfaser. Alternativt kan k_1 och k_2 bestämmas stegvis (se tillägg 5 för en beskrivning och jämförelse av dessa metoder). Utsöndringskonstanten (k_2) kan behöva korrigeras för utspädning på grund av tillväxt (se punkterna 72 och 73). Om det är uppenbart att upptagnings- och/eller utsöndringskurvan inte är en kurva av första ordningen, ska mer komplexa modeller tillämpas (se litteraturhänvisningar i tillägg 5) och råd inhämtas från biostatistiker och/eller farmakokinetiker.

Uppgifter om fiskens vikt/längd

Våtvikt för enskilda fiskar och totala längder för alla provtagningsintervall anges i separata tabeller för test- och kontrollgrupperna under upptagningsfasen (inklusive stampopulationen för upptagningsfasens start) och utsöndringsfasen. Uppmätt vikt och längd för varje enskild fisk kopplas till den analyserade kemikaliekoncentrationen, t.ex. genom användning av en unik identifieringskod för varje fisk. Vikt är det lämpligaste tillväxtmåttet för att korrigera kinetiska BCF-värden för utspädning på grund av tillväxt (den metod som används för att korrigera data för utspädning på grund av tillväxt beskrivs i punkt 73 och tillägg 5).

Korrigerig för utspädning på grund av tillväxt och fettnormalisering

Fiskens tillväxt under utsöndringsfasen kan sänka de uppmätta kemikaliska koncentrationerna i fisken, vilket leder till att den totala utsöndringskonstanten (k_2) är högre än den skulle vara på grund av enbart elimineringsprocesser (t.ex. andning, metabolism, egestion). Kinetiska biokoncentrationsfaktorer bör därför korrigeras för utspädning på grund av tillväxt. BCF_{ss} påverkas också av tillväxt, men det finns inget vedertaget förfarande för att korrigera BCF_{ss} för tillväxt. Om tillväxten är signifikant bör även BCF_k korrigeras för tillväxt (BCF_{kg}), härledas eftersom detta kan vara ett mer relevant mått för biokoncentrationsfaktorn. Testfiskens fetthalt (som har ett starkt samband med bioackumulering av hydrofoba ämnen) kan variera så mycket i praktiken att det krävs en normalisering för att man ska kunna bestämma fiskens fetthalt (5 viktprocent) och presentera både kinetiska och stabila biokoncentrationsfaktorer på ett meningsfullt sätt, om det inte kan hävdas att testämnet inte primärt ackumuleras i fett (vissa perfluorerade ämnen kan t.ex. bindas till proteiner). Ekvationer och exempel på sådana beräkningar finns i tillägg 5.

För att korrigera en kinetisk BCF för utspädning på grund av tillväxt måste utsöndringskonstanten korrigeras för tillväxt. Den tillväxtkorrigerade utsöndringskonstanten (k_{2g}) beräknas genom att tillväxtkonstanten (k_g , erhålls från data om uppmätt vikt) dras av från den totala utsöndringskonstanten (k_2). Därefter beräknas den tillväxtkorrigerade kinetiska biokoncentrationsfaktorn genom att upptagningskonstanten (k_1) divideras med den tillväxtkorrigerade utsöndringskonstanten (k_{2g}) (jfr tillägg 5). I vissa fall kan detta tillvägagångssätt vara problematiskt. För ämnen med mycket långsam utsöndring som testas på snabbväxande fisk kan den härledda k_{2g} vara mycket liten, vilket innebär att felet i de två konstanter som används för att få fram detta värde blir kritiskt, och i andra fall kan k_g -uppskattningarna vara större än k_2 . Ett alternativt tillvägagångssätt som undviker behovet av korrigerig för utspädning på grund av tillväxt är att använda utsöndringsdata för massa av testämne per fisk (hela fiskar) i stället för koncentrationsdata för massa av testämne per enhetsmassa av fisk, vilket är det vanliga. Detta är enkelt att åstadkomma eftersom testerna enligt denna testmetod bör koppla registrerade vävnadskoncentrationer till enskilda fiskars längd. Det enkla förfarandet för att göra detta beskrivs i tillägg 5. Observera att k_2 fortfarande ska rapporteras även om detta alternativa tillvägagångssätt används.

Kinetiska och stabila biokoncentrationsfaktorer bör även redovisas i förhållande till standardvärdet för fetthalt i fisk på 5 viktprocent om det inte kan hävdas att testämnet inte primärt ackumuleras i fett. Data om koncentrationer i fisk eller BCF normaliseras enligt förhållandet mellan 5 % och den faktiska (individuella) genomsnittliga fetthalten (procentandelen våtvikt) (jfr tillägg 5).

Om kemiska analyser och fettanalyser har gjorts av samma fisk ska normaliserade data om fetthalt för enskilda fiskar användas för att beräkna BCF normaliserad för fetthalt. Om tillväxten hos kontrollfisken och den exponerade fisken är liknande kan endast kontrollfiskens fetthalt alternativt användas för att korrigera fetthalten (jfr punkt 56). En beräkningsmetod för BCF normaliserad för fetthalt beskrivs i tillägg 5.

Tolkning av resultaten

Resultaten ska tolkas med försiktighet när uppmätta koncentrationer av den undersökta lösningen påträffas på nivåer nära den analytiska metodens gränsvärde för detektion.

Den genomsnittliga tillväxten i både test- och kontrollgrupperna ska i princip inte skilja sig nämnvärt för att utesluta toxiska effekter. De två gruppernas tillväxtkonstanter eller tillväxtkurvor bör jämföras med ett lämpligt förfarande⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Ett t-test av tillväxtkonstanterna kan utföras för att undersöka om tillväxten skiljer sig mellan kontroll- och testgrupperna, eller ett F-test om man analyserar variansen. Vid behov kan ett F-test eller sannolikhetsförhållandet användas som underlag för valet av lämplig tillväxtmodell (OECD monograf 54, (32)).

Tydligt definierade upptagnings- och utsöndringskurvor är en indikation på att biokoncentrationsdata är av god kvalitet. För konstanterna bör resultatet av ett test av anpassningsgraden ("goodness of fit") av typen χ^2 visa en god anpassningsgrad (dvs. låg felprocent för mätningen (32)) för bioackumuleringsmodellen för att konstanterna ska anses vara tillförlitliga (jfr tillägg 5). Om fler än en testkoncentration används ska skillnaden i upptagnings-/utsöndringskonstanterna mellan provningskoncentrationerna vara mindre än 20 % ⁽¹⁾. Om inte bör koncentrationsberoende anges. Observera att väsentliga skillnader i upptagnings-/utsöndringskonstanterna mellan de tillämpade provningskoncentrationerna ska registreras och om möjligt förklaras. Om undersökningen är väl utformad ligger konfidensgränsen 95 % för BCF i regel nära ± 20 % av den härledda BCF.

Om två eller fler koncentrationer testas används resultaten från båda eller alla koncentrationerna för att undersöka om resultaten är konsekventa och visa om koncentrationsberoende föreligger. Om bara en koncentration testas för att minska antalet använda djur och/eller resurser bör detta motiveras.

Den resulterande BCF_{ss} är osäker om BCF_k är betydligt större än BCF_{ss} , eftersom detta kan vara en indikation på att stabilt tillstånd inte uppnåtts eller att utspädning på grund av tillväxt och förlustprocesser inte har beaktats. Om BCF_{ss} är mycket högre än BCF_k bör härledningen av upptagnings- och utsöndringskonstanterna kontrolleras för fel och omvärderas. Ett annorlunda anpassningsförfarande kan förbättra uppskattningen av BCF_k (jfr Appendix 5).

Testrapport

Förutom den information om testämnet som anges i punkt 3 ska testrapporten innehålla följande uppgifter:

Testämne:

Fysisk form och, när så är tillämpligt, fysikalisk-kemiska egenskaper.

- Kemisk beteckning, såsom IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, SMILES- eller InCh-kod, strukturell formel, renhet, kemisk beteckning för orenheter i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt osv. (vid behov, inklusive halten organiskt kol).
- För multikomponentämnen och UVCB (kemiska ämnen med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiska material), så långt det är möjligt, en beskrivning av de enskilda beståndsdelarnas kemiska identitet och procentandel av ämnets totala massa för varje beståndsdel. En sammanfattning av hur analysmetoden i testet återspeglar ämnets koncentrationsmått samt en beskrivning av alla analytiska förfaranden, inklusive metodens noggrannhet, detektionsgräns och kvantifieringsgräns.
- Om ämnet är radioaktivt märkt ska den märkta atomens exakta position och andelen radioaktivitet kopplad till föreningarna anges.
- Information om testämnets toxicitet för fisk (helst testarterna). Toxiciteten bör redovisas som akut 96-t LC_{50} och som NOAEC och LOAEC från en kronisk studie (dvs. test i tidigare levnadsstadier eller ett fullständigt livscykeltest om ett sådant finns tillgängligt).
- Lagringsförhållanden för testkemikalien eller testämnet samt deras stabilitet under lagringsförhållandena om de lagras före användning.

Testade arter:

Vetenskapligt namn, stam, källa, eventuell förbehandling, aklimatisering, ålder, kön (om relevant) storleksintervall (vikt och längd) osv.

⁽¹⁾ Dessa procentsiffror förutsätter att analysmodellerna är tillförlitliga och att halveringstiden är < 14 dagar. Om analysmodellerna är mindre tillförlitliga eller halveringstiden ökas (stort) blir dessa siffror högre.

Testbetingelser:

- Använt testförfarande (t.ex. genomflödestest eller semistatiskt test), ordinarie eller minimerad utformning (inklusive grund och motivering).
- Belysningens typ och egenskaper samt ljusperiod(er).
- Provets utformning, t.ex. antal och storlek på provningskammare, vattenväxlingshastighet, fisktäthet, antal replikat, antal fiskar per replikat, antal provningskoncentrationer, upptagnings- och utsöndringsfasernas längd, provtagningsfrekvens för fisk och vatten.
- Metod för beredning av stamlösningar och förnyelsefrekvensen (lösningsmedel, dess koncentration och bidrag till innehåll av organiskt kol i provningsvattnet bör anges när sådan används) eller en beskrivning av alternativa doseringssystem.
- Nominella provningsförhållanden, medelvärden för uppmätta värden samt deras standardavvikelser i provningskärlen och metod och frekvens som använts för beräkning av dessa värden.
- Utspädningsvattnets ursprung, beskrivning av eventuell förbehandling, resultat från eventuell undersökning av fiskens förmåga att överleva i vattnet, samt vattnets karakteristik: pH, hårdhet, temperatur, koncentration löst syre, klorrestvärde (om detta mäts), total mängd organiskt kol, uppslammade fasta partiklar, salthalt i det undersökta mediet (om tillämpligt) och eventuella andra gjorda mätningar
- Vattenkvalitet i provningskärlen, pH, hårdhet, TOC, temperatur och syrehalt, använda metoder och mättningsfrekvens.
- Detaljerad information om utfodringen (t.ex. fodertyp, källa, sammansättning (åtminstone fett- och proteininnehåll)), valt utfodringsintervall, mängd och frekvens.
- Information om behandlingen av fisk- och vattenprover, inklusive uppgifter om beredning, förvaring, extraktion och analytiska förfaranden (och precision) för testämnet och fettinnehållet.
- Metoder för behandlingsrandomisering och fördelning av fisk till testkärlen.
- Uppgifter om hur fisken tillförs till testkärlen samt testets varaktighet.
- Beskrivning av preliminära tester och resultat, i förekommande fall.

Resultat:

- Resultat från eventuell preliminär studie.
- Dödligheten för kontrollfisken och fisken i varje exponerat kärl, samt eventuellt observerat onormalt beteende.
- Information om eventuella observerade negativa effekter.
- Fullständig beskrivning av alla kemiska analysförfaranden, inklusive detektions- och kvantifieringsgränser, variabilitet och återhämtning.
- Fiskens fetthalt, inklusive använd metod och normaliseringsfaktor för fetthalten om den härleds (L_n , en faktor som används för att uttrycka resultat när det gäller fetthalten på 5 %).
- Data i tabellform om fiskens vikt (och längd), kopplade till kemiska koncentrationer hos enskilda fiskar (och fetthalt i förekommande fall), för både kontroll- och exponeringsgrupperna (t.ex. med användning av unik identifiering av varje provtagningsfisk) samt beräkningar av härledda tillväxtkonstanter.
- Data i tabellform om testämnets koncentration (C_p , kopplad till enskilda fiskar) och vatten (C_w) (med medelvärden för test- och kontrollgrupperna, standardavvikelse och intervall, i förekommande fall) för alla provtagningsstillfällen (C_p uttryckt i mg/kg våtvikt av hela kroppen eller specifika vävnader, t.ex. fett samt C_w i mg/l). C_w -värden för kontrollserierna (bakgrundsvärdet ska också redovisas).

- Kurvor (med alla uppmätta data) som visar följande (i förekommande fall kan koncentrationerna uttryckas i förhållande till hela kroppen och fetthalten normaliseras till 5 % av fisken eller specifika vävnader).
- Tillväxt, dvs. fiskens vikt som funktion av tiden eller den naturliga logaritmen av vikten som funktion av tiden (inklusive den härledda tillväxtkonstanten k_g).
- Testämnets upptagning och utsöndring i fisken (i ett diagram).
- Tid till stabilt tillstånd (om det uppnås).
- Den naturliga logaritmen av koncentrationen som funktion av upptagningstiden (inklusive den härledda upptagningskonstanten k_1).
- Den naturliga logaritmen av koncentrationen (ln-koncentration) som funktion av utsöndringstiden (inklusive den härledda upptagningskonstanten k_2).
- Både upptagnings- och utsöndringsfaskurvorna, som visar både data och den anpassade modellen.
- Om en visuell inspektion av ett diagram visar uppenbara avvikande värden kan ett statistiskt giltigt test för avvikande värden tillämpas för att avlägsna felaktiga datapunkter. Uteslutandet av dessa värden ska dokumenteras och motiveras.
- Biokoncentrationsfaktorn i stabilt tillstånd (BCF_{ss}), om stabilt tillstånd (nästan) har uppnåtts.
- Kinetisk biokoncentrationsfaktor (BCF_k) och härledda upptagnings- och utsöndringskonstanter k_1 och k_2 , tillsammans med varianser i k_2 (lutning och skärningspunkt) om gradvis anpassning används.
- Konfidensgränser, standardavvikelser (i förekommande fall) och metoder för beräkning/dataanalys för varje parameter för varje koncentration av det använda testämnet.
- Eventuell information om metaboliter från radioaktivt märkta testämnen och metaboliternas ackumulation.
- Tillväxtkonstanter (inklusive konfidensintervall på 95 %) och beräknad utsöndringskonstant korrigerad för tillväxt (k_{2g}), halveringstid och BCF -värden (BCF_{kg}).
- Eventuella anmärkningar avseende undersökning, eventuell avvikelse från förfarandet och annan relevant information.
- En sammanfattning av relevanta uppmätta och beräknade data, enligt följande:

Upptagnings- och utsöndringskonstanter för ämnet samt biokoncentrationsfaktorer (BCF)	
k_g (tillväxtkonstant, dag^{-1}):	Insatsvärde (95 % CI) ⁽¹⁾
k_1 (total upptagningskonstant, $\text{l kg}^{-1} \text{dag}^{-1}$):	Insatsvärde (95 % CI) ⁽¹⁾
k_2 (total utsöndringskonstant, dag^{-1}):	Insatsvärde (95 % CI) ⁽¹⁾
k_{2g} (tillväxtkorrigerad utsöndringskonstant, dag^{-1}):	Insatsvärde (95 % CI) ⁽¹⁾
C_f (kemisk koncentration i fisken vid stabilt tillstånd, mg kg^{-1}):	Insatsvärde $\pm$ SD ⁽²⁾
C_w (kemisk koncentration i vattnet, mg l^{-1}):	Insatsvärde $\pm$ SD ⁽²⁾
L_n (normaliseringsfaktor för fetthalt):	Insatsvärde ⁽³⁾

Upptagnings- och utsöndringskonstanter för ämnet samt biokoncentrationsfaktorer (BCF)	
BCF _{ss} (BCF i stabilt tillstånd l kg ⁻¹)	Insatsvärde ± SD ⁽²⁾
BCF _{SSL} (normaliserad fetthalt, BCF i stabilt tillstånd, l kg ⁻¹):	Insatsvärde ⁽³⁾ ± SD ⁽²⁾
BCF _k (kinetisk BCF, l kg ⁻¹)	Insatsvärde (95 % CI) ⁽¹⁾
BCF _{kg} (tillväxtkorrigerad kinetisk BCF, l kg ⁻¹)	Insatsvärde (95 % CI) ⁽¹⁾
t _{1/2g} (tillväxtkorrigerad halveringstid, dag):	Insatsvärde (95 % CI) ⁽¹⁾
BCF _{KL} (kinetisk BCF normaliserad för fetthalt, l kg ⁻¹):	Insatsvärde
BCF _{KLg} (normaliserad fetthalt, tillväxtkorrigerad kinetisk BCF, l kg ⁻¹):	Insatsvärde

⁽¹⁾ CI: konfidensintervall (om en uppskattning är möjlig)
⁽²⁾ SD: Standardavvikelse (om en uppskattning är möjlig)

Resultat som redovisas som t.ex. "ej upptäckt/kvantifierad vid detektions-/kvantifieringsgränsen" vid framtagningen av undersökningsmetoden och dess experimentella utformning bör undvikas, eftersom sådana resultat inte kan användas för beräkning av hastighetskonstanter.

C.13 – II: Test på fisk med minimerad exponering via vatten

INLEDNING

Den ökande erfarenheten av att utföra och tolka det fullständiga testet, både bland laboratorier och tillsynsmyndigheter, visar att första ordningen kinetik, med vissa undantag, gäller för uppskattningen av upptagnings- och utsöndringskonstanterna. Upptagnings- och utsöndringskonstanterna kan därför uppskattas med ett minimum av provtagningspunkter, och kinetisk BCF kan härledas.

Syftet med att undersöka alternativa utformningar av BCF-undersökningar var ursprungligen att utveckla ett mindre test som kan användas i det mellanliggande testningssteget för att vederlägga eller bekräfta BCF-uppskattningar baserat på K_{ow} och QSAR:s, och eliminera behovet av en fullständig undersökning för många ämnen. Ett annat skäl var att minska kostnaderna och användningen av försöksdjur genom att minska provtagningen och antalet analytiska sekvenser. Det nya testet har samma utformning som den tidigare testmetoden för att möjliggöra integration av testresultaten med befintlig BCF-data och underlätta testningen och tolkningen genom att tillhandahålla BCF-uppskattningar med tillräcklig noggrannhet och precision för riskbedömningsbeslut. Många av övervägandena är desamma som i det fullständiga testet, t.ex. giltighetskriterierna (jfr punkt 24) och att testet ska upphöra om obetydlig upptagning registreras i slutet av upptagningsfasen (jfr punkterna 16 och 38).

De ämnen som kan komma i fråga för det minimerade testet bör höra till det allmänna område som testmetoden utvecklades för, dvs. icke-polära organiska ämnen (jfr punkt 49). Om det finns indikationer på att det ämne som ska testas kan bete sig på ett annorlunda sätt (t.ex. en tydlig avvikelse från första ordningens kinetik) bör ett fullständigt test utföras för tillsynsändamål.

Det minimerade testet körs vanligen inte under en kortare period än standard-BCF-testet, men antalet provtagningar är färre (grunden för detta anges i tillägg 6). Utsöndringsperioden kan dock förkortas för snabbt utsöndrande ämnen för att undvika att koncentrationerna i fisken faller under detektions-/kvantifieringsgränsen innan testet avslutas. Ett minimerat fiskexponeringstest med en enda koncentration kan användas för att fastställa om ett fullständigt test behövs. Om de data som används för att beräkna konstanter och BCF är robusta (jfr punkt 93) kan man avstå från att utföra det fullständiga testet om den resulterande BCF ligger långt från lagstadgade riskgränser.

I vissa fall kan det vara fördelaktigt att utföra det minimerade testet med fler än en testkoncentration som ett preliminärt test för att avgöra om BCF-uppskattningarna för ett ämne är koncentrationsberoende. Om BCF-uppskattningarna från det minimerade testet visar koncentrationsberoende måste det fullständiga testet utföras. Om BCF-uppskattningarna baserat på ett minimerat test inte är koncentrationsberoende men resultaten inte anses vara definitiva, kan ett eventuellt fullständigt test utföras vid en enda koncentration. På så sätt används färre djur jämfört med ett fullständigt test med två (eller flera) koncentrationer.

Ämnen som eventuellt kan komma i fråga för det minimerade testet bör uppfylla följande kriterier:

- Sannolikt uppvisa ungefärlig första ordningens upptagnings- och utsöndringskinetik, härlett från jämförelser med liknande ämnen.
- Ha en $\log K_{ow} < 6$, om inte snabb metabolism förväntas ⁽¹⁾.
- Vara tillräckligt vattenlösliga med avseende på analystekniken (jfr punkt 24).
- Vara tydligt kvantifierbara (dvs. koncentrationerna bör vara minst en storleksordning över kvantifieringsgränsen) både i fisk och vatten. Radioaktiv märkning rekommenderas (jfr punkt 23).
- Ha en utsöndringsperiod som är längre än den förutsagda halveringstiden (jfr tillägg 5 för beräkningar), eller så bör utsöndringsfasens varaktighet justeras därefter (jfr punkt 91). Undantag från denna regel är tillåtna om ämnet förväntas ha en snabb metabolism.

PROVTAGNINGSSCHEMA FÖR DET MINIMERADE TESTET

Provtagning av fisk

Provtagningen av fisken minskas till fyra provtagningspunkter:

- I mitten och i slutet av upptagningsfasen (den senare utgör början av utsöndringsfasen), t.ex. efter 14 och 28 dagar (33).
- I mitten av utsöndringsfasen och när undersökningen avslutas (om ämneskoncentrationen är < 10 % av den maximala koncentrationen eller åtminstone tydligt längre än en halveringstid för ämnet), t.ex. efter 7 och 14 dagars utsöndring (33). Om snabb utsöndring förväntas eller observeras kan det vara nödvändigt att förkorta utsöndringsperioden för att undvika att koncentrationerna i fisken faller under kvantifieringsgränsen.
- Mätning av fetthalten som i en fullständig undersökning.
- Korrigering för tillväxt som i en fullständig undersökning.
- BCB beräknas som kinetisk BCF.

Vattenprovtagning

I det minimerade testet tas prover av vattnet som i den fullständiga undersökningen (jfr punkt 54) eller åtminstone vid fem tillfällen jämnt fördelade under upptagningsfasen samt veckovis under utsöndringsfasen.

⁽¹⁾ Det minimerade testet kan användas för att visa snabb metabolism när det är känt att detta är sannolikt.

Ändringar av utformningen

Med beaktande av testämnets egenskaper, giltiga QSAR-prediktioner och det specifika ändamålet med undersökningen kan vissa ändringar av undersökningens utformning övervägas:

- Om större precision krävs kan fler fiskar (sex eller åtta i stället för fyra) användas för provet i slutet av upptagningsfasen.
- En extra grupp av fiskar kan inbegripas om utsöndringen efter 14 dagar (eller när utsöndringsfasen beräknas avslutas) inte har varit tillräcklig för lämplig utsöndring (dvs. > 50 %). Om den förutsagda varaktigheten av utsöndringsfasen är kortare eller längre än 14 dagar kan provtagnings-schemat anpassas (dvs. en grupp av fiskar vid den tidpunkt då utsöndringsfasen beräknas avslutas och en grupp efter halva den tiden).
- Två testkoncentrationer kan användas för att undersöka eventuellt koncentrationsberoende. Om resultaten från det minimerade testet utfört med två testkoncentrationer visar att BCF inte är koncentrationsberoende (dvs. varierar med mindre än 20 %) kan en testkoncentration anses vara tillräcklig i det fullständiga testet, om det utförs.
- Modeller för bioackumuleringsprocesser som den som föreslagits av Arnot m.fl. (35) kan sannolikt användas som hjälp i planeringen av längden för upptagnings- och utsöndringsfaserna (se även tillägg 5).

Beräkningar

Den logiska grunden för denna metod är att biokoncentrationsfaktorn i ett fullständigt test antingen kan bestämmas som biokoncentrationsfaktorn i stabilt tillstånd (BCF_{ss}) genom att beräkna förhållandet mellan koncentrationen av testämnet i fiskens vävnader och testämnets koncentration i vatten, eller genom att beräkna den kinetiska biokoncentrationsfaktorn (BCF_k) som förhållandet mellan upptagningshastighetskonstanten k_1 och utsöndringskonstanten k_2 . BCF_k är giltig även om ämnets koncentration inte uppnår stabilt tillstånd under upptagningsfasen, under förutsättning att upptagningen och utsöndringen sker ungefär enligt första ordningens kinetiska processer. Som ett absolut minimum krävs två datapunkter för att uppskatta upptagnings- och utsöndringskonstanterna, en i slutet av upptagningsfasen (dvs. i början av utsöndringsfasen) och en i slutet (eller efter en betydande del) av utsöndringsfasen. Den mellanliggande provtagningspunkten rekommenderas som kontroll av upptagnings- och utsöndringskinetiken ⁽¹⁾. Beräkningar anges i tilläggen 5 och 6.

Tolkning av resultaten.

För att bedöma testets giltighet och informationsvärde måste man kontrollera att utsöndringsperioden är längre än en halveringstid. Även BCF_{km} (kinetisk BCF, härledd från ett minimerat test) bör jämföras med det minimerade värdet för BCF_{ss} (som är BCF_{ss} beräknad i slutet av upptagningsfasen, med antagandet att stabilt tillstånd har uppnåtts). Detta kan bara antas, eftersom antalet provtagningspunkter inte är tillräckligt för att bevisa detta. Om $BCF_{km} < \text{minimerad } BCF_{ss}$ bör minimerad BCF_{ss} vara det föredragna värdet. Om BCF_{km} är mindre än 70 % av den minimerade BCF_{ss} är resultaten inte giltiga och ett fullständigt test bör genomföras.

Om det minimerade testet ger en BCF_{km} i intervallet för ett värde som ger upphov till risk bör ett fullständigt test utföras. Om resultatet ligger långt ett utanför ett värde som ger upphov till risk (långt över eller långt under) kan ett fullständigt test inte vara nödvändigt, eller så kan ett fullständigt test med en enda koncentration utföras om det krävs enligt det relevanta regelverket.

Om ett fullständigt test visar sig vara nödvändigt efter ett minimerat test vid en koncentration kan det fullständiga testet utföras vid en andra koncentration. Om resultaten är konsekventa behöver man inte utföra ett ytterligare fullständigt test vid en annan koncentration eftersom ämnets biokoncentration inte förväntas vara koncentrationsberoende. Om det minimerade testet har utförts vid två koncentrationer och resultaten inte visar på koncentrationsbeteende kan det fullständiga testet utföras med endast en koncentration (jfr punkt 87).

⁽¹⁾ När endast två datapunkter mäts kan uppskattningar av konfidensgränserna för BCF_{km} göras med hjälp av bootstrappingmetoder. När även mellanliggande datapunkter finns tillgängliga kan konfidensgränserna för BCF_{km} beräknas som i det fullständiga testet.

Testrapport

Testrapporten för det minimerade testet ska innehålla all information som krävs för det fullständiga testet (jfr punkt 81), med undantag för uppgifter som inte kan tas fram (dvs. en kurva som visar tiden till stabilt tillstånd och biokoncentrationsfaktorn för stabilt tillstånd; för den senare bör minimerad BCF_{ss} anges i stället). Testrapporten ska även innehålla en förklaring av skälet till att det minimerade testet använts samt resulterande BCF_{km} .

C.13 – III: Test av bioackumulering i fisk genom exponering via föda

INLEDNING

Den metod som beskrivs i detta avsnitt bör användas för ämnen där metoden för exponering via vatten inte är praktiskt genomförbar (t.ex. på grund av att stabila mätbara vattenkoncentrationer inte kan upprätthållas eller lämplig kroppsbelastning inte kan uppnås inom 60 dagars exponering, se föregående avsnitt om vattenexponeringsmetoden). Man bör dock vara medveten om att endpointen för test med exponering via föda är en biomagnifikationsfaktor (BMF), inte en biokoncentrationsfaktor (BCF) ⁽¹⁾.

I maj 2001 presenterades en ny metod för testning av bioackumulering för organiska ämnen som är svårslösliga i vatten vid SETAC:s Europakonferens som hölls i Madrid (36). Arbetet bygger på olika rapporterade bioackumuleringsstudier i litteraturen, med användning av en doseringsmetod med foder behandlat med testämne (nedan kallat *behandlat foder*) (t.ex. (37)). Tidigt 2004 lades ett utkast till protokoll (38), som utformats för att mäta bioackumuleringspotentialen hos organiska ämnen som är svårslösliga i vatten, för vilka standardmetoden för biokoncentration med exponering via vatten inte är praktiskt genomförbar, tillsammans med ett bakgrundsdokument (39) fram för en EU-PBT-arbetsgrupp. En ytterligare motivering för metoden var att eventuell miljöexponering för sådana svårslösliga ämnen (dvs. $\log K_{ow} > 5$) ofta kan ske via föda (jfr (40) (41) (42) (43) (44)). Av denna anledning innehåller vissa offentliggjorda kemikalieföreskrifter hänvisningar till tester med exponering via föda ⁽²⁾. Man bör dock vara medveten om att i den metod som beskrivs här undviks exponering via vattenfasen noggrant, vilket innebär att ett BMF-värde från detta test inte kan jämföras direkt med ett BMF-värde från en fältstudie (där både exponering via vatten och föda kan kombineras).

Det här avsnittet baseras på detta protokoll (38) och en ny metod som inte fanns med i den föregående versionen av testmetod C.13. Detta alternativa test gör det möjligt att direkt undersöka exponeringsvägen via föda under kontrollerade laborieförhållanden.

Forskare bör konsultera punkterna 1 till 14 i denna testmetod för information om när testet med exponering via föda är att föredra framför vattenexponeringstestet. Avsnittet innehåller även information om vad man bör tänka på när det gäller olika ämnen och denna information bör konsulteras innan ett test genomförs.

Användning av radioaktivt märkta testämnen kan övervägas och här gäller samma hänsynstaganden som för vattenexponeringsmetoden (jfr punkterna 6 och 65).

Metoden med exponering via föda kan användas för att testa fler än ett ämne i ett enda test. Vissa villkor måste dock vara uppfyllda, som beskrivs närmare i punkt 112. För enkelhetens skull används endast ett testämne i den testmetod som beskrivs här.

Testet med exponering via föda liknar vattenexponeringsmetoden i många avseenden, naturligtvis med undantag för exponeringsvägen. Många aspekter av den metod som beskrivs här överlappar därför den vattenexponeringsmetod som beskrivs i det föregående avsnittet. Korshänvisningar till relevanta punkter i föregående avsnitt görs i möjligaste mån, men för att underlätta läsningen och förståelsen är det oundvikligt att viss information upprepas.

⁽¹⁾ Se tillägg 1 för definitioner och enheter.

⁽²⁾ Vid tillämpningen av förordning (EG) nr 1907/2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach) (EGT L 396, 30.12.2006, s. 1) tas denna fråga upp i Vägledning om informationskrav och kemikaliesäkerhetsbedömning, kapitel R.7c, R.7.10.3.1, R.7.10.4.1 och figur R7.10-2.

TESTMETODENS PRINCIP

Genomflödes- eller semistatiska betingelser kan användas (jfr punkt 4). Genomflödesbetingelser rekommenderas för att begränsa eventuell exponering av testämnet via vatten till följd av desorption från behandlat foder eller avföring. Testet består av två faser: upptagning (testämnet i behandlat foder) och utsöndring (rent, obehandlat foder (jfr punkt 16)). I upptagningsfasen utfodras en "testgrupp" av fiskar dagligen med en fast föda bestående av ett kommersiellt fiskfoder med känd sammansättning, som behandlas med testämnet. Fisken bör helst äta allt foder som ges (jfr punkt 141). Fisken utfodras sedan med det rena, obehandlade kommersiella fiskfodret under utsöndringsfasen. Precis som för vattenexponeringsmetoden kan fler än en testgrupp med andra behandlade testämneskoncentrationer användas vid behov, men för de flesta av de starkt hydrofoba organiska testämnena är en testgrupp tillräcklig (jfr punkterna 49 och 107). Om semistatiska betingelser används bör fisken överföras till ett nytt medium och/eller en ny testkammare i slutet av upptagningsfasen (i det fall de medier och/eller apparater som används i upptagningsfasen har förorenats med testämnet genom läckage). Testämnets koncentrationer i fisken mäts i båda faserna av testet. Förutom den grupp fiskar som utfodras med det behandlade fodret (testgruppen) hålls och utfodras en kontrollgrupp av fiskar under identiska betingelser, förutom att det kommersiella fiskfodret inte är behandlat med testämnet. Denna kontrollgrupp möjliggör kvantifiering av testämnets bakgrunds nivåer hos oexponerad fisk och tjänar som en jämförelse med avseende på eventuella behandlingsrelaterade negativa effekter som noteras hos testgrupperna ⁽¹⁾. Kontrollgruppen möjliggör också jämförelser av tillväxtkonstanterna mellan grupperna som en kontroll av att liknande mängder av fodret har konsumerats (eventuella skillnader i fodrets smaklighet bör också övervägas som ett skäl till att tillväxtkonstanterna skiljer sig åt (jfr punkt 138)). Det är viktigt att test- och kontrollgrupperna utfodras med foder med samma näringsvärde under både upptagnings- och utsöndringsfasen.

Baserat på metodutvecklarnas erfarenheter är en upptagningsfas på 7–14 dagar vanligen tillräcklig (38) (39). Denna längd kan minimera kostnaden för testet, samtidigt som tillräcklig exponering säkerställs för de flesta ämnen. I vissa fall kan upptagningsfasen dock behöva förlängas (jfr punkt 127). Ämneskoncentrationen i fisken kanske inte når stabilt tillstånd under upptagningsfasen. Databehandling och resultat från denna metod baseras därför vanligen på en kinetisk analys av vävnadsrester. (Obs: Ekvationer för uppskattning av tiden till stabilt tillstånd kan tillämpas på samma sätt som för exponeringstestet i vatten – se tillägg 5). Utsöndringsfasen inleds när fisken börjar utfodras med obehandlat foder och varar i regel upp till 28 dagar eller tills testämnet inte längre kan kvantifieras i hel fisk, beroende av vad som inträffar först. Utsöndringsfasen kan förkortas eller förlängas utöver de 28 dagarna, beroende på förändringar i tid i uppmätta kemiska koncentrationer och fiskens storlek.

Denna metod gör det möjligt att bestämma ämnesspecifik halveringstid ($t_{1/2}$, från utsöndringskonstanten, k_2), assimilerings effektivitet (absorption genom tarmen, a), kinetisk biomagnifikationsfaktor för födotest (BMF_k), tillväxt-korrigerad kinetisk biomagnifikationsfaktor för födotest (BMF_{kg}) och kinetisk biomagnifikationsfaktor korrigerad för fetthalt ⁽²⁾ (BMF_{kl}) (och/eller biomagnifikationsfaktor korrigerad för tillväxt och fetthalt, BMF_{kgl}) för testämnet i fisken. Precis som för vattenexponeringsmetoden kommer ökningen av fiskmassa under testet att leda till en utspädning av testämnet i växande fisk, och (den kinetiska) BMF kommer att underskattas om den inte korrigeras för tillväxt (jfr punkterna 162 och 163). Om det uppskattas att stabilt tillstånd uppnåddes i upptagningsfasen kan en vägledande BMF för stabilt tillstånd beräknas. Det finns metoder som gör det möjligt att uppskatta en kinetisk biokoncentrationsfaktor (BCF_k) från de data som genereras i testet med exponering via föda (t.ex. (44) (45) (46) (47) (48)). För- och nackdelar med sådana metoder diskuteras i tillägg 8.

Testet utformades ursprungligen för svårslösliga icke-polära organiska ämnen, som ungefär följer första ordningens kinetik för upptagning och utsöndring hos fisk. Om ett testat ämne inte ungefär följer första ordningens kinetik för upptagning och utsöndring ska mer komplexa modeller tillämpas (se litteraturhänvisningar i tillägg 5) och råd inhämtas från biostatistiker och/eller farmakokinetiker.

⁽¹⁾ De flesta testämnen bör helst inte kunna detekteras i kontrollvattnet. Bakgrunds koncentrationerna bör endast vara relevanta för naturligt förekommande material (t.ex. vissa metaller) och ämnen som finns överallt i miljön.

⁽²⁾ Eftersom BMF definieras som förhållandet mellan ett ämnes koncentration i en organism och i organismens foder vid stabilt tillstånd beaktas fetthalten genom en korrigering för fetthalten i organismen och i fodret, och beskrivs därför mer exakt som en "korrigering". Denna metod skiljer sig från "normalisering" till en fastställd fetthalt hos organismen, vilket görs i biokoncentrationstestet med vattenexponering.

BMF fastställs vanligen med en analys av testämnet i hel fisk (våtvikt). Om det är relevant för undersökningens syften kan specifika vävnader (t.ex. muskler, lever) provtas om fisken delas upp i ätliga och oätliga delar (jfr punkt 21). Dessutom kan man avlägsna mag-tarmkanalen och analysera den separat för att bestämma bidraget till koncentrationer i hela fiskar för provtagningspunkter i slutet av upptagningsfasen och nära början av utsöndringsfasen, eller som en del av en massbalansmetod.

Fetthalten i hela provtagningsfiskar bör mätas så att koncentrationerna kan korrigeras för fetthalt, med beaktande av fetthalten både i fodret och hos fisken (jfr punkterna 56 och 57 samt tillägg 7).

Enskilda provtagningsfiskars vikt bör mätas och registreras och kopplas till den analyserade kemiska koncentrationen hos de enskilda fiskarna (t.ex. rapporterad med en unik identifieringskod för varje provtagningsfisk) för att beräkna eventuell tillväxt under testet. Fiskens totala längd bör också mätas om det är möjligt⁽¹⁾. Viktdata är också nödvändiga för att uppskatta BCF med hjälp av utsöndringsdata från testet med exponering via föda.

INFORMATION OM TESTÄMNET

Information om testämnet enligt beskrivningen i punkterna 3 och 22 bör finnas tillgänglig. Vanligen behövs ingen analytisk metod för testämneskoncentrationerna i vatten. Metoderna måste vara tillräckligt känsliga för att mäta koncentrationerna i fiskfodret och fiskvävnaderna.

Metoden kan användas för att testa fler än ett ämne i ett enda test. Testämnena bör emellertid vara kompatibla med varandra så att de inte samverkar eller ändrar sin kemiska identitet när de blandas i fiskfodret. Syftet är att skillnaderna mellan de uppmätta resultaten för varje ämne som testas tillsammans inte ska vara stora jämfört med om individuella tester hade gjorts av varje testämne. Preliminärt analysarbete bör fastställa att varje ämne kan återhämtas från foder som behandlats med flera ämnen och från fiskvävnadsproverna med i) hög återhämtning (t. ex. > 85 % av nominalvärdet), och ii) den nödvändiga sensitiviteten för testning. Den totala dosen för ämnen som testas tillsammans bör vara lägre än den kombinerade koncentration som kan orsaka toxiska effekter (jfr punkt 51). Dessutom bör eventuella negativa effekter hos fisken och risken för interaktiva effekter (t.ex. metaboliska effekter) i samband med testning av flera ämnen samtidigt beaktas i utformningen av försöket. Samtidig testning av ämnen som kan joniseras bör undvikas. När det gäller exponering är metoden även lämplig för komplexa blandningar (jfr punkt 13), även om samma analysbegränsningar som för andra metoder gäller).

TESTETS GILTIGHET

För att ett test ska vara giltigt måste följande villkor uppfyllas (jfr punkt 24):

- Vattentemperaturen ska variera med mindre än ± 2 °C hos behandlings- och kontrollgrupperna.
- Koncentrationen löst syre får inte falla under luftmättnadsvärdet på 60 %.
- Koncentrationen av testämnet i fiskfodret före och efter slutet av upptagningsfasen ska ligga inom intervallet ± 20 % (baserat på minst tre prover vid båda tidpunkterna).
- Ämnet ska visa en hög nivå av homogenitet i fodret i den preliminära analysen av det behandlade fodret. Minst tre provkoncentrationer för ämnet som tas vid teststarten ska inte variera med mer än ± 15 % från medelvärdet.

⁽¹⁾ Dessutom bör total längd registreras under testet, eftersom detta är en bra indikator på eventuella negativa effekter.

- Koncentrationer av testämnet ska inte detekteras eller endast förekomma vid typiska spårnivåer i obehandlat foder eller i kontrollfiskarnas vävnader i förhållande till de behandlade proverna.
- Dödlighet eller andra negativa effekter/sjukdomar hos både kontroll- och testgrupperna ska vara $\leq 10\%$ i slutet av testet. Om testet förlängs av någon anledning ska negativa effekter i båda grupperna vara $\leq 5\%$ per månad och $\leq 30\%$ kumulativt. Signifikanta skillnader i den genomsnittliga tillväxten mellan test- och kontrollgrupperna kan vara en indikation på testämnets toxiska effekt.

REFERENSÄMNEN

Om ett laboratorium inte har utfört testet tidigare eller väsentliga förändringar (t.ex. förändringar av fiskstammen eller leverantören, andra fiskarter, signifikant ändring av fiskens storlek, foder eller inblandningsmetod osv.) har gjorts är det lämpligt att en teknisk kompetensstudie utförs med ett referensämne. Referensämnet används främst för att fastställa huruvida tekniken för att behandla fodret är lämplig för att garantera maximal homogenitet och biotillgänglighet för testämnena. Ett exempel som har använts när det gäller icke-polära hydrofoba ämnen är hexaklorbensen (HCB) men andra ämnen med tillförlitliga data om upptagning och biomagnifikation bör övervägas med tanke på HCB:s farliga egenskaper⁽¹⁾. Om referensämnena används bör grundläggande information anges i testrapporten, inklusive beteckning, renhet, CAS-nummer, struktur och toxicitetsdata (i förekommande fall), precis som för testämnena (jfr punkterna 3 och 22).

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Utrustning

Material och apparater bör användas enligt beskrivningen i vattenexponeringsmetoden (jfr punkt 26). Ett testsystem med genomflöde eller statisk förnyelse som ger en tillräcklig volym av utspädningsvatten till testtankarna bör användas. Flödestakten bör registreras.

Vatten

Testvatten bör användas enligt beskrivningen i vattenexponeringsmetoden (jfr punkterna 27–29). Testmediet bör karakteriseras enligt beskrivningen och bör hålla en konstant kvalitet under testet. Halten av naturliga partiklar och totalt organiskt kol bör vara så låga som möjligt (≤ 5 mg/l partiklar, ≤ 2 mg/l totalt organiskt kol) innan testet inleds. TOC behöver endast mätas före testet som en del av testvattenkaraktiseringen (jfr punkt 53).

Foder

Ett kommersiellt tillgängligt fiskfoder (flytande och/eller långsamt sjunkande pelleterat foder) som karakteriseras för minst protein- och fetthalt rekommenderas. Foderpelletarna bör ha en enhetlig storlek för att öka effektiviteten i foderexponeringen, dvs. fisken äter mer av fodret i stället för att äta de större bitarna och missa de mindre. Pelletarna bör ha en lämplig storlek i förhållande till fiskens storlek i början av testet (t.ex. kan pellets med en diameter på ungefär 0,6–0,85 mm för fisk med en total längd på 3–7 cm och 0,85–1,2 mm för fisk med en total längd på 6–12 cm användas). Pelletsstorleken kan justeras beroende på fiskens tillväxt i början av utsöndringsfasen. Ett exempel på en lämplig fodersammansättning som finns kommersiellt tillgänglig ges i tillägg 7. Testfoder med en total fetthalt på mellan 15 och 20 viktprocent har vanligen använts vid utvecklingen av denna metod. Fiskfoder med en så hög fetthalt kanske inte finns tillgänglig i vissa regioner. I ett sådant fall kan undersökningen utföras med foder med en lägre fetthalt, och vid behov kan utfodringsintervallerna justeras på lämpligt sätt för att upprätthålla fiskens hälsa (baserat på preliminära tester). Den totala fetthalten i fodret för test- och kontrollgruppen ska mätas och registreras innan testet inleds och i slutet av upptagningsfasen. Uppgifter från leverantören av det kommersiella fodret om analys av näringsämnena, fetthalt, fibrer och aska, och om möjligt mineraler och bekämpningsmedelsrester (t.ex. "vanliga" prioriterade förorenande ämnen), bör anges i undersökningsrapporten.

⁽¹⁾ HCB finns med i bilagorna A och C till Stockholmskonventionen och i bilagorna I och III till förordning (EG) nr 850/2004 om långlivade organiska föreningar (EUT L 158, 30.4.2004, s. 7).

När fodret behandlas med testämnet måste man försäkra sig om att testfodret är homogent. Koncentrationen av testämnet i fodret för testgruppen bör väljas med hänsyn till analysteknikens sensitivitet, testämnets toxicitet (NOEC om känt) samt relevanta fysikalisk-kemiska data. Om ett referensämne används bör det helst inbegripas i en koncentration kring 10 % av testämnets koncentration (den bör i alla händelser vara så låg som möjligt) beroende på analysens sensitivitet (för hexaklorbensen har t.ex. en koncentration i fodret på 1–100 µg/g befunnits godtagbar, jfr (47) för mer information om HCB:s assimileringseffektivitet).

Testämnet kan blandas i fiskfodret på olika sätt beroende på dess fysikaliska egenskaper och löslighet (närmare uppgifter om inblandningsmetoder anges i tillägg 7):

- Om testämnet är lösligt och har stabila triglycerider bör ämnet lösas upp i en liten mängd fiskolja eller ätbar vegetabilisk olja innan det blandas med fiskfodret. I detta fall bör man vara noga med att undvika att producera en ranson som har för hög fetthalt, med hänsyn till den naturliga fetthalten i det behandlade fodret, genom att tillsätta den minsta kända oljemängd som krävs för att uppnå en jämn fördelning av testämnet i fodret.
- Fodret bör behandlas med hjälp av ett lämpligt organiskt lösningsmedel, utan att det påverkar homogeniteten och biotillgängligheten (det kan hända att (mikro)kristaller av testämnet bildas i fodret till följd av lösningsmedlets avdunstning och det är svårt att visa att detta inte har skett, jfr (49)).
- Icke-viskösa vätskor bör tillsättas direkt i fiskfodret, men de bör vara väl blandade för att säkerställa homogenitet och underlätta assimilering. Blandningstekniken bör säkerställa homogenitet i det behandlade fodret.

I ett fåtal fall, t.ex. när det gäller mindre hydrofoba testämnen som mer sannolikt desorberas från fodret, kan det vara nödvändigt att täcka de beredda foderpelletarna med en liten mängd majs-/fiskolja (se punkt 142). I ett sådant fall bör kontrollfodret behandlas på liknande sätt och det färdigberedda fodret användas för mätning av fetthalten.

Om referensämnen användas bör deras resultat vara jämförbara med data från litteraturen om undersökningar som har utförts under liknande förhållanden med jämförbara utfodringsintervaller (jfr punkt 45) och specifika parametrar för referensämnena bör uppfylla de relevanta kriterierna i punkt 113 (tredje, fjärde och femte styckena).

Om en bärarolja eller ett bärarlösningsmedel används som vehikel för testämnet bör en motsvarande mängd av samma vehikel (exklusive testämnet) blandas med kontrollfodret så att den motsvarar det behandlade fodret. Det är viktigt att test- och kontrollgrupperna utfodras med foder med samma näringsvärde under både upptagnings- och utsöndringsfasen.

Det behandlade fodret bör förvaras under förhållanden där testämnets stabilitet i foderblandningen upprätthålls (t. ex. kylning). Förvaringsförhållandena ska redovisas.

Val av fiskart

Samma fiskarter som anges för vattenexponeringstestet kan användas (jfr punkt 32 och tillägg 3). Regnbåge (*Oncorhynchus mykiss*), karp (*Cyprinus carpio*) och knölskallelöja (*Pimephales promelas*) har ofta använts i studier av bioackumulering av organiska ämnen vid exponering via föda innan denna testmetod publicerades. Testarterna bör ha ett födobeteende som ger snabb konsumtion av de givna foderransonerna för att säkerställa att eventuella faktorer som kan påverka testämnets koncentration i fodret (t.ex. läckage till vatten och möjlighet till vattenexponering) begränsas till ett minimum. Fisk inom det rekommenderade storleks-/viktintervallet (jfr tillägg 3) bör användas. Fisken får inte vara så liten att den blir svår att analysera individuellt. Fiskarter som testas under ett stadium med snabb tillväxt kan försvåra datatolkningen, och hög tillväxttakt kan påverka beräkningen av assimileringseffektiviteten ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ För snabb tillväxt under upptagningsfasen minskar det faktiska utfodringsintervallet under det intervall som fastställdes i början av exponeringen.

Fiskhållning

Acceptanskriterierna för acklimatisering, dödlighet och sjukdom är desamma som för vattenexponeringstestet innan testet utförs (jfr punkterna 33–35).

TESTFÖRFARANDE

Förberedande arbete och preliminärt test

Förberedande analytiskt arbete är nödvändigt för att visa att ämnet återhämtas från det behandlade fodret/den behandlade fiskvävnaden. Ett preliminärt test för att välja en lämplig koncentration i fodret är inte alltid nödvändigt. Preliminära försök kan utföras för att visa att inga negativa effekter observeras och utvärdera om det behandlade fodret är smakligt samt av analysmetodens sensitivitet för fiskvävnader och foder och val av lämpliga utfodrings- och provtagningsintervall under utsöndringsfasen osv. Detta är dock inte obligatoriskt. En preliminär undersökning kan dock vara värdefull för att uppskatta det fiskantal som behövs för provtagning under utsöndringsfasen. Detta kan leda till en avsevärd minskning av fiskantalet, speciellt för testämnen som är särskilt mottagliga för metabolism.

Exponeringsförhållanden

Upptagningsfasens längd

En upptagningsfas på 7–14 dagar är vanligen tillräcklig. Under denna fas utfodras en fiskgrupp dagligen med kontrollfodret och en annan grupp med testfodret med en fast ranson beroende på vilka arter som testas och försöksbetingelserna, t.ex. 1–2 % av kroppsvikten (våtvikt) för regnbåge. Foderintervallerna bör väljas så att snabb tillväxt och stora ökningar av fetthalten undviks. Vid behov kan upptagningsfasen förlängas baserat på praktisk erfarenhet från tidigare undersökningar eller kunskap om testämnets (eller det analoga ämnets) upptagning/utsöndring i fisk. Teststarten är tidpunkten för den första utfodringen med behandlat foder. En försöksdag löper från utfodringsstartpunkten till kort före tidpunkten för nästa utfodring (t.ex. en timme). Den första försöksdagen för upptagningen löper således från tidpunkten för den första utfodringen med behandlat foder och avslutas kort före den andra utfodringen med behandlat foder. I praktiken avslutas upptagningsfasen kort före (t.ex. en timme) den första utfodringen med obehandlat testfoder, eftersom fisken fortsätter att smälta det obehandlade fodret och absorberar testämnet under de mellanliggande 24 timmarna. Det är viktigt att se till att en tillräcklig hög (icke-toxisk) kroppsbelastning uppnås för testämnet med avseende på analysmetoden, så att åtminstone en minskning av storleksordningen kan mätas under utsöndringsfasen. I specialfall kan en förlängd upptagningsfas (upp till 28 dagar) användas med ytterligare provtagning för att ge insikt i upptagningskinetiken. Koncentrationen i fisken får inte nå stabilt tillstånd under upptagningsfasen. Ekvationer för uppskattning av tiden till stabilt tillstånd som en indikation på den tid som sannolikt krävs för att uppnå uppskattbara koncentrationer i fisken kan tillämpas här på samma sätt som för vattenexponeringstestet (jfr tillägg 5).

I vissa fall kan det vara känt att upptagning av ämnet i fisken under 7–14 dagar inte är tillräckligt för att den använda foderkoncentrationen ska nå en tillräcklig hög koncentration i fisken så att minst en minskning av storleksordningen kan analyseras under utsöndringsfasen, antingen på grund av dålig analyskänslighet eller låg assimileringseffektivitet. I sådana fall kan det vara lämpligt att förlänga den inledande utfodringsfasen länge än 14 dagar, eller överväga en högre foderkoncentration, särskilt för starkt metaboliserande ämnen. Det är dock viktigt att se till att kroppsbelastningen under upptaget hålls under den (uppskattade) kroniska nolleffektkoncentrationen (NOEC) i fiskvävnad (jfr 138).

Utsöndringsfasens varaktighet

Utsöndringsfasen varar vanligen i upp till 28 dagar, och börjar när testgruppens fiskar utfodras med rent, obehandlat foder efter upptagningsfasen. Utsöndringsfasen inleds med den första utfodringen med "obehandlat" foder i stället för direkt efter den sista utfodringen med "behandlat" foder, eftersom fisken kommer att fortsätta att smälta fodret och absorbera testämnet under de mellanliggande 24 timmarna, såsom anges i punkt 126. Det första provet i utsöndringsfasen tas därför kort före den andra utfodringen med obehandlat foder. Utsöndringsperioden är utformad för att fånga upp ämnen med en potentiell halveringstid på upp till 14 dagar, vilket överensstämmer med halveringstiden för bioackumulerande ämnen⁽¹⁾, så 28 dagar utgör två halveringstider för sådana ämnen. Om mycket bioackumulerande ämnen används kan det vara bra att förlänga utsöndringsfasen (om detta påvisas i preliminära tester).

Om ämnet utsöndras mycket långsamt så att en exakt halveringstid inte kan fastställas under utsöndringsfasen kan informationen ändå vara tillräcklig i utvärderingssyfte för att ange en hög bioackumuleringsnivå. Även det motsatta gäller, dvs. om ett ämne utsöndras så snabbt att en tillförlitlig nollkoncentration i tiden (koncentrationen i slutet av upptagningen/början på utsöndringsfasen, $C_{0,d}$) och k_2 inte kan härledas kan en konservativ uppskattning göras av k_2 (jfr tillägg 7).

Om analyser av fisken vid tidigare intervaller (t.ex. 7 eller 14 dagar) visar att ämnet har utsöndrats under kvantifieringsnivåerna innan hela 28-dagarsperioden kan provtagningen avbrytas och testet avslutas.

I ett fåtal fall kan det hända att ingen mätbar upptagning av testämnet har uppstått vid slutet av upptagningsperioden (eller i det andra utsöndringsprovet). Om det kan påvisas att i) giltighetskriteriet i punkt 113 är uppfyllt, och ii) att den bristande upptagningen inte beror på andra brister i testet (t.ex. att upptagningsfasen inte är tillräckligt lång, brister i tekniken för att behandla fodret som leder till dålig biotillgänglighet, bristande känslighet hos analysmetoden, fisken konsumerar inte fodret osv.) kan undersökningen avslutas utan att behöva göras om med en längre upptagningsfas. Om preliminärt arbete har visat att så kan vara fallet kan det vara lämpligt att analysera avföring (om det är möjligt) för osmält testämne som ett led i en massbalansmetod.

Antal testfiskar

Som i vattenexponeringstestet bör fiskar med liknande vikt och längd väljas. Den minsta fiskens vikt får inte vara mindre än minst två tredjedelar av den största fiskens vikt (jfr punkterna 40–42)

Totalt fiskantal för undersökningen bör väljas baserat på provtagningsschemat (minst ett prov i slutet av upptagningsfasen och fyra till sex prover under utsöndringsfasen, men detta beror på fasernas längd), med hänsyn till analysteknikens sensitivitet, den koncentration som sannolikt kommer att uppnås i slutet av upptagningsfasen (baserat på befintlig kunskap) och utsöndringsfasens varaktighet (om befintlig kunskap möjliggör uppskattningar). Fem till tio fiskar bör provtas varje gång. Tillväxtparametrarna (vikt och total längd) mäts före den kemiska analysen eller analysen av fetthalt.

På grund av de naturliga variationerna i storlek, tillväxttakt och fysiologi mellan fiskarna och den sannolika variationen i mängden foder som varje fisk konsumerar bör minst fem fiskar provtas i varje intervall från testgruppen och fem från kontrollgruppen för att korrekt fastställa den genomsnittliga koncentrationen och dess variabilitet. Variabiliteten mellan den använda fisken bidrar sannolikt mer till den totala okontrollerade variabiliteten i testet än de analytiska metodernas inneboende variabilitet, vilket motiverar användningen av upp till tio fiskar per provtagningsspunkt i vissa fall. Om bakgrundstestämnets koncentrationer i kontrollfisken inte är mätbara i början av utsöndringsfasen är kemisk analys av två–tre kontrollfiskar i det sista provtagningsintervallet endast tillräckligt om prover tas av den återstående kontrollfisken vid samtliga kontrollpunkter för att kontrollera vikt och total längd (så att prover tas från samma antal fiskar från test- och kontrollgrupperna för att kontrollera tillväxten). Fisken lagras, vägs individuellt (även om det visar sig vara nödvändigt att kombinera provresultaten i ett senare skede) och den totala vikten mäts.

⁽¹⁾ I en vattenexponeringsundersökning motsvarar en halveringstid på 14 dagar en BCF på cirka 10 000 l/kg med användning av fisk på 1 g med en motsvarande upptagning på omkring 500 l/kg/dag (enligt den ekvation som tagits fram av Sijm m.fl.(46)).

För ett standardtest med en 28 dagar lång utsöndringsfas med fem utsöndringsprover innebär detta att det behövs sammanlagt 59–120 fiskar från testgruppen och 50–110 från kontrollgruppen, om man förutsätter att analystekniken för ämnet gör det möjligt att utföra en analys av fetthalten av samma fisk. Om analysen av fetthalt inte kan utföras på samma fisk som den kemiska analysen och det inte heller är möjligt att bara använda kontrollfisken för att analysera fetthalten (jfr punkt 56), behövs ytterligare 15 fiskar (tre från stampopulationen vid teststarten, tre var från kontroll- och testgrupperna i början av utsöndringsfasen och tre var från kontroll- och testgrupperna i slutet av försöket). Ett exempel på provtagningschema med fiskantal finns i tillägg 4.

Fisktäthet

En liknande hög fisktäthet som för vattenexponeringsmetoden bör användas (jfr punkterna 43 och 44). Även om fisktätheten inte påverkar exponeringskoncentrationerna i testet rekommenderas en fisktäthet på 0,1–1,0 g fisk (våtvikt) per liter vatten per dag för att upprätthålla lämpliga koncentrationer löst syre och minimera stressen för testorganismerna.

Testfoder och utfodring

Under aklimatiseringsperioden bör fisken utfodras med lämpligt foder enligt beskrivningen ovan (punkt 117). Om testet utförs under genomflödesförhållanden bör flödet stängas av medan fisken utfodras.

Under testet bör det foder som ges till testgruppen följa beskrivningen ovan (punkterna 116–121). Förutom att överväga ämnesspecifika faktorer, analytisk sensitivitet, förväntad koncentration i fodret under miljöförhållanden och kroniska toxicitetsnivåer/kroppsbeklastning bör man vid val av målkoncentration efter inblandning av testämnet även beakta fodrets smaklighet (så att fisken inte undviker att äta). Nominell koncentration efter inblandning av testämnet ska dokumenteras i rapporten. Baserat på tidigare erfarenhet ger koncentrationer i intervallet 1–1 000 µg/g en praktisk verkningsradie för testämnen som inte har en specifik toxisk mekanism. För ämnen som verkar via en icke-specifik mekanism bör resthalterna i vävnaden inte överstiga 5 µmol/g fett, eftersom rester över denna nivå sannolikt kommer att innebära kroniska effekter (19) (48) (50) ⁽¹⁾. För andra ämnen är det viktigt att säkerställa att inga negativa effekter uppstår till följd av ackumulerad exponering (jfr punkt 127). Detta gäller särskilt om fler än ett ämne testas samtidigt (jfr punkt 112).

En lämplig mängd av testämnet ska blandas i fiskfodret. Det finns tre sätt att göra detta, som beskrivs i punkt 119 och tillägg 7. Metoderna och procedurerna för att behandla fodret ska dokumenteras i rapporten. Kontrollfisken utfodras med obehandlat foder som innehåller en motsvarande mängd av obehandlad oljevehikel om en sådan har använts i det behandlade fodret för upptagningsfasen eller om det har behandlats med ett "rent" lösningsmedel om en lösningsmedelsvehikel har använts för beredningen av testgruppens foder. Analytiska mätningar av testämneskoncentrationen i det behandlade och obehandlade fodret bör göras i minst tre exemplar innan upptagningsfasen inleds och vid slutet av upptagningsfasen. Efter exponering för det behandlade fodret (upptagningsfasen) utfodras fisken (båda grupperna) med obehandlat foder (utsöndringsfasen).

Fisken utfodras med en fast ranson (beroende på art, t.ex. cirka 1–2 % av våtvikten per dag när det gäller regnbåge). Foderintervallerna bör väljas så att snabb tillväxt och stora ökningar av fetthalten undviks. Det exakta utfodringsintervallet under försöket ska registreras. I början bör utfodringen baseras på schemalagda viktupptagningsmätningar av stampopulationen, som görs just före teststarten. Fodermängden bör justeras baserat på provtagningsfiskens våtvikt vid varje provtagningsstillfälle för att ta hänsyn till tillväxten under försöket. Vikt och längd för fiskarna i test- och kontrolltankarna kan uppskattas från vikten och totallängden för de fiskar som används vid varje provtagningsstillfälle. Återstående fisk i test- och kontrolltankarna ska inte mätas. Det är viktigt att upprätthålla samma fasta utfodringsintervall under försöket.

⁽¹⁾ Eftersom de faktiska interna koncentrationerna inte kan bestämmas förrän testet har utförts krävs en uppskattning av den förväntade interna koncentrationen (t.ex. baserat på förväntad BMF och koncentration i fodret, jfr ekvation A5.8 i tillägg 5).

Utfodringen bör observeras för att se till att fisken synbart konsumerar allt foder som ges så att ett lämpligt värde för intag används i beräkningarna. Preliminära utfodringsförsök eller tidigare erfarenhet bör beaktas vid valet av utfodringsintervall för att se till att allt foder från utfodringen en gång per dag konsumeras. Om fodret konsekvent lämnas oätet kan det vara tillrådligt att sprida dosen över en extra utfodringsperiod under varje försöksdag (t.ex. ersätta utfodring en gång per dag med utfodring med halva mängden två gånger om dagen. Om detta är nödvändigt bör den andra utfodringen ske vid en fast tidpunkt och planeras så att den sker så tidigt som möjligt före provtagningen av fisken (den andra utfodringen sker t.ex. under första halvan av en försöksdag).

Även om fisken i allmänhet konsumerar fodret snabbt är det viktigt att se till att ämnet förblir adsorberat till fodret. Man bör vara noga med att undvika att testämnet sprids i vattnet från fodret, vilket gör att fisken exponeras för vattenkoncentrationer av testämnet utöver exponeringen via föda. Detta kan åstadkommas genom ett eventuellt oätet foder (och avföring) avlägsnas från test- och kontrolltankarna inom en timme efter utfodringen, men helst inom 30 minuter. Dessutom kan man använda ett system där vattnet kontinuerligt renas genom ett aktivt kolfilter för att absorbera eventuella upplösta föroreningar. Genomflödessystem kan bidra till att snabbt skölja bort foderpartiklar och upplösta ämnen⁽¹⁾. I vissa fall kan en något modifierad teknik för beredning av behandlat foder begränsa detta problem (se punkt 119).

Ljus och temperatur

Precis som för vattenexponeringsmetoden (jfr punkt 48) rekommenderas en fotoperiod på 12–16 timmar. Temperaturen ($\pm 2^\circ\text{C}$) bör vara lämplig för de arter som testas (jfr tillägg 3). Belysningens typ och egenskaper ska vara kända och dokumenterade.

Kontroller

En kontrollgrupp bör användas, där fisken utfordras med samma ranson som testgruppen, men utan testämne i fodret. Om en olje- eller lösningsmedelsvehikel har använts för att behandla testgruppens foder bör kontrollgruppens foder behandlas på exakt samma sätt, men utan testämnet, så att test- och kontrollgruppens foder är likvärdiga (jfr punkterna 121 och 139).

Frekvens för mätningar av vattenkvaliteten

De betingelser som beskrivs i vattenexponeringsmetoden gäller även här, förutom att TOC endast behöver mätas före testet som ett led i karakteriseringen av testvattnet (punkt 53).

Provtagning och analys av fisk och foder

Analys av kostprover

Prover av test- och kontrollfoder bör analyseras i minst tre exemplar när det gäller testämne och fetthalt, åtminstone före början av och vid slutet av upptagningsfasen. Analysmetoder och förfaranden för att säkerställa att fodret är homogent ska anges i rapporten.

⁽¹⁾ Förekomst av testämnet i testmediet till följd av fiskens avföring eller läckage från fodret kanske inte kan undvikas helt. Ett alternativ är därför att mäta ämneskoncentrationen i vattnet i slutet av upptagningsperioden, särskilt om en semistatistisk utformning används, för att fastställa om vattenexponering har uppstått.

Proverna ska analyseras med avseende på testämnet med den etablerade och validerade metoden. Förberedande arbete bör utföras för att fastställa kvantifieringsgräns, återhämtning i procent, störningar och analytisk variabilitet i den avsedda provmatrisen. Om radioaktivt märkt material testas bör liknande överväganden som för vattenexponeringsmetoden göras, förutom att foderanalysen ersätter vattenanalysen (jfr punkt 65).

Analys av fisken

Vid varje provtagningstillfälle tas prover från 5–10 fiskar från exponerings- och kontrollbehandlingarna (i vissa fall kan antalet kontrollfisk minskas, jfr punkt 134).

Provtagningen bör göras vid samma tidpunkt varje försöksdag (i förhållande till utfodringstidpunkten) och bör planeras så att sannolikheten för att foder finns kvar i tarmen under upptagningsfasen och det tidiga skedet av utsöndringsfasen minimeras i syfte att undvika felaktiga bidrag till de totala testämnescykler. (Dvs. provtagningfisken avlägsnas i slutet av försöksdagen med tanke på att en försöksdag inleds vid utfodrings-tidpunkten och avslutas vid tidpunkten för nästa utfodring, omkring 24 timmar senare. Utsöndringen inleds vid den första utfodringen med obehandlat foder, jfr punkt 128.) Provet från den första utsöndringsfasen (som tas kort efter den andra utfodringen med obehandlat foder) är viktig eftersom extrapoleringen en dag tillbaka från denna mätning används för att uppskatta nollkoncentrationen i tiden ($C_{0,d}$, koncentrationen i fisken i slutet av upptagningsfasen/i början av utsöndringsfasen). Eventuellt kan fiskens mag-tarmkanal avlägsnas och analyseras separat i slutet av upptagningsfasen och dag 1 och 3 av utsöndringsfasen.

Fisken avlägsnas från båda testkärlen vid varje provtagningstillfälle och behandlas på samma sätt som beskrivningen i vattenexponeringsmetoden (jfr punkterna 61–63).

Koncentrationer av testämnet i hela fiskar (våtvikt) mäts åtminstone i slutet av upptagningsfasen och under utsöndringsfasen i både kontroll- och testgrupperna. Under utsöndringsfasen rekommenderas fyra till sex provtagningpunkter (t.ex. 1, 3, 7, 14 och 28 dagar). Eventuellt kan en ytterligare provtagningpunkt inbegripas efter 1–3 dagars upptagning för att uppskatta assimilerings effektiviteten från den linjära fasen av upptagningen i fisken medan den fortfarande befinner sig i början av exponeringsperioden. Det finns två viktiga avvikelser från schemat: i) om en förlängd upptagningsfas används för att undersöka upptagningskinetiken ökas antalet provtagningpunkter under upptagningsfasen, vilket innebär att mer fisk behövs (jfr punkt 126), och ii) om undersökningen avslutas i slutet av upptagningsfasen på grund av att det inte finns en mätbar upptagning (jfr punkt 131). Enskilda provtagningfiskar bör vägas (och totalvikten registreras) för att kunna fastställa tillväxtkonstanterna. Koncentrationer av ämnet i specifik fiskvävnad (ätbara och icke ätbara delar) kan också mätas i slutet av upptagningsfasen och vid valda tillfällen under utsöndringsfasen. Om radioaktivt märkt material testas bör liknande överväganden som för vattenexponeringsmetoden göras, förutom att foderanalysen ersätter vattenanalysen (jfr punkt 65).

Om ett referensämne används regelbundet (jfr punkt 25) bör koncentrationerna mätas i testgruppen i slutet av upptagningsfasen och vid alla tidpunkter under utsöndringsfasen som har fastställts för testämnet (hel fisk). Koncentrationerna behöver bara analyseras i kontrollgruppen i slutet av upptagningsfasen (hel fisk). Under vissa omständigheter (t.ex. om analysteknikerna för test- och referensämnet är inkompatibla så att ytterligare fisk behövs för att följa provtagningsschemat) kan en annan metod användas enligt nedan för att minimera antalet ytterligare fiskar som behövs. Koncentrationer av referensämnet mäts endast under utsöndringsfasen, dagarna 1, 3 och vid två ytterligare provtagningpunkter som väljs så att tillförlitliga nollkoncentrationer i tiden ($C_{0,d}$) och k_2 kan göras för referensämnet.

Om möjligt bör fetthalten hos de enskilda fiskarna fastställas vid varje provtagningstillfälle, eller åtminstone i början och i slutet av upptagningsfasen och i slutet av utsöndringsfasen (jfr punkterna 56 och 67). Beroende på analytisk metod (se punkt 67 och tillägg 4) kan det vara möjligt att använda samma fisk för att fastställa både fetthalt och testämnets koncentration. Detta är att föredra för att minska antalet använd fisk. Om det inte är möjligt kan samma metod som beskrivs i vattenexponeringsmetoden användas (alternativa möjligheter att mäta fetthalten anges i punkt 56). Den metod som används för att kvantifiera fetthalten ska dokumenteras i rapporten.

Analysmetodens kvalitet

Försökskontroller bör utföras för att säkerställa den ämnesspecifika analysteknikens specificitet, noggrannhet, precision och reproducerbarhet samt återhämtning av testämnet i både foder och fisk.

Mätning av fiskens tillväxt

När testet inleds vägs ett prov av fiskar från stampopulationen och deras totallängd mäts. Fiskproverna bör tas kort före den första utfodringen med behandlat foder (t.ex. en timme) och anvisas till försöksdag 0. Antalet fiskar i detta prov bör vara minst detsamma som för proverna under testet. En del av dessa kan vara samma fisk som användes för analysen av fetthalt innan upptagningsfasens början (jfr punkt 153). Fisken vägs först och mäts sedan vid varje provtagningsintervall. Uppmätt vikt (och längd) för varje enskild fisk kopplas till den analyserade kemikaliekoncentrationen (och fetthalten i förekommande fall), t.ex. genom användning av en unik identifieringskod för varje fisk. Mätningarna av dessa provtagningsfiskar kan användas för att uppskatta vikt (och längd) för den fisk som är kvar i testet och kontrolltankarna.

Försöksutvärdering

Observationer av dödlighet ska göras och registreras dagligen. Ytterligare observationer av eventuella negativa effekter ska utföras, t.ex. onormalt beteende eller pigmentering. Resultaten ska registreras. Fisken anses död om den inte har några andningsrörelser och inte reagerar på svag mekanisk retning. Död eller tydligt döende fisk ska avlägsnas.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

Testresultaten används för att härleda utsöndringskonstanten (k_2) som en funktion av fiskens totala våtvikt. Tillväxtkonstanten, k_g , baserad på den genomsnittliga ökningen av fiskens vikt, beräknas och används i förekommande fall för att få fram en tillväxtkorrigerad utsöndringskonstant, k_{2g} . Dessutom ska assimilerings effektivitet (a , absorption från tarmen), kinetisk biomagnifikationsfaktor (BMF_k) (vid behov tillväxtkorrigerad, BMF_{kg}), dess värde korrigerat för fetthalt (BMF_{KL} eller BMF_{kgL} , vid korrigering för utspädning på grund av tillväxt) samt utfodringsintervall redovisas. Om en uppskattning av tid till stabilt tillstånd i upptagningsfasen kan göras (t.ex. 95 % av stabilt tillstånd eller $t_{95} = 3,0/k_2$), kan en uppskattning av BMF i stabilt tillstånd (BMF_{ss}) inbegripas (jfr punkterna 105 och 106 samt tillägg 5) om värdet t_{95} visar att förhållanden för stabilt tillstånd kan ha uppnåtts. Samma korrigering för fetthalt bör tillämpas på denna BMF_{ss} som för den kinetiskt härledda BMF (BMF_k) för att få fram ett värde korrigerat för fetthalt, BMF_{ssL} (observera att det inte finns ett vedertaget förfarande för att korrigera en stabil BMF för utspädning på grund av tillväxt). Formler och exempelberäkningar finns i tillägg 7. Det finns metoder som gör det möjligt att uppskatta en kinetisk biokoncentrationsfaktor (BCF_k) från de data som genereras i testet med exponering via föda. Detta diskuteras i tillägg 8.

Uppgifter om fiskens vikt/längd

Våtvikt och längder för enskilda fiskar för alla tidsperioder anges i separata tabeller för test- och kontrollgrupperna för alla provtagningsdagar under upptagningsfasen (stampopulationen för upptagningsfasens start, kontroll- och testgruppen för slutet av upptagningsperioden och, om den utförs, för den tidiga fasen (t.ex. dag 1–3 för upptagningsfasen) och utsöndringsfasen (t.ex. dagarna 1, 2, 4, 7, 14 och 28 för kontroll- och testgruppen). Vikt är det lämpligaste måttet för korrigeringar av utspädning på grund av tillväxt. De metoder som används för att korrigera data för utspädning på grund av tillväxt beskrivs nedan (se punkterna 162 och 163 samt tillägg 5).

Data om testämnets koncentration i fisken

Mätningar av rester av testämnet hos enskilda fiskar (eller sammanslagna fiskprover om individuella fiskmätningar inte är möjliga), uttryckt i våtviktsskoncentration (massförhållande) ställs upp i tabellform för test- och kontrollfisken för de olika provtagningstillfällena. Om en analys av fetthalt har utförts av varje provtagningsfisk kan individuella koncentrationer korregerade för fetthalt, i form av fettkoncentration (massförhållande, fett), härledas och ställas upp i tabellform.

- Mätningar av rester av testämnet hos enskilda fiskar (eller sammanslagna fiskprover om individuella fiskmätningar inte är möjliga, jfr punkt 66) för utsöndringsperioden konverteras till sina naturliga logaritmer och avsätts mot tiden (dag). Om en visuell inspektion av diagrammet visar uppenbara avvikande värden kan ett statistiskt giltigt test för avvikande värden tillämpas för att avlägsna felaktiga datapunkter. Uteslutandet av dessa värden ska dokumenteras och motiveras.
- En linjär korrelation med minsta kvadratmetoden beräknas för $\ln(\text{koncentration})$ som funktion av utsöndringsdata (dag). Linjens lutning och skärningspunkt redovisas som total utsöndringskonstant (k_2) och som den naturliga logaritmen för den härledda nollkoncentrationen i tid ($C_{0,d}$) (jfr tilläggen 5 och 7 för en närmare beskrivning). Om detta inte är möjligt på grund av att koncentrationerna faller under kvantifieringsgränsen för det andra utsöndringsprovet kan en konservativ uppskattning av k_2 göras (jfr tillägg 7).
- Varianserna i linjens lutning och skärningspunkt beräknas med statistiska standardförfaranden och konfidensintervallerna 90 % (eller 95 %) runt dessa resultat utvärderas och redovisas.
- Genomsnittlig uppmätt fiskkoncentration för den sista dagen i upptagningsfasen (uppmätt nollkoncentration i tiden, $C_{0,m}$) beräknas också och jämförs med det härledda värdet $C_{0,d}$. Om det härledda värdet är lägre än det uppmätta värdet kan skillnaden tyda på förekomst av osmält behandlat foder i tarmen. Om det härledda värdet är mycket högre än det uppmätta värdet kan det tyda på att det värde som härletts från den linjära regressionen av utsöndringsdata är felaktigt och bör omvärderas (se tillägg 7).

Utsöndringskonstant och biomagnifikationsfaktor

För att beräkna biomagnifikationsfaktorn från sina data måste man först få fram assimileringseffektiviteten (absorption av testämnet genom tarmen, a). Ekvation A7.1 i tillägg 7 används för detta. Härledd koncentration i fisken vid tidpunkten noll i utsöndringsfasen ($C_{0,d}$), (total) utsöndringskonstant (k_2), koncentration i fodret (C_{fod}), foderintagskonstant (I) och upptagningsperiodens varaktighet (t) vara kända. Lutningen och skärningspunkten i det linjära förhållandet mellan $\ln(\text{koncentration})$ och utsöndringstid redovisas som total utsöndringskonstant ($k_2 = \text{lutning}$) och nollkoncentration i tid ($C_{0,d} = e^{\text{intercept}}$), enligt ovan. De härledda värdena ska kontrolleras med avseende på biologisk rimlighet (t.ex. assimileringseffektivitet som en fraktion är inte större än 1). (I) beräknas genom att fodermassan divideras med den fiskmassa som utfodras varje dag (vid utfodring av 2 % av kroppsvikten blir (I) 0,02). Det utfodringsintervall som används i beräkningen kan dock behöva justeras för fiskens tillväxt (detta kan göras genom att man använder den kända tillväxtkonstanten för att uppskatta fiskens vikt vid varje tidpunkt under upptagningsfasen (jfr tillägg 7). Om k_2 och $C_{0,d}$ inte kan härledas för att koncentrationerna t.ex. faller under detektionsgränsen för det andra utsöndringsprovet kan en konservativ uppskattning av k_2 och en BMF_k med en övre gräns göras (jfr tillägg 7).

När man väl har fått fram assimileringseffektiviteten (a) kan biomagnifikationsfaktorn beräknas genom att a multipliceras med foderintagskonstanten (I) och divideras med den (totala) utsöndringskonstanten (k_2). Den tillväxt-korrigerade biomagnifikationsfaktorn beräknas på samma sätt, men med användning av den tillväxtkorrigerade utsöndringskonstanten (k_{2g} , jfr punkterna 162 och 163. En alternativ uppskattning av assimileringseffektiviteten kan härledas om en vävnadsanalys har gjorts av fisk som provtagits i den tidiga, linjära fasen av upptagningsfasen, jfr punkt 151 och tillägg 7. Detta värde utgör en oberoende uppskattning av assimileringseffektiviteten för en i huvudsak oexponerad organism (dvs. fisken befinner sig i början av upptagningsfasen). Assimileringseffektivitet uppskattad från utsöndringsdata används vanligen för att härleda BMF .

Korrigerig för fetthalt och korrigerig för utspädning på grund av tillväxt

Fiskens tillväxt under utsöndringsfasen kan sänka de uppmätta kemikaliska koncentrationerna i fisken, vilket leder till att den totala utsöndringskonstanten, k_2 , är högre än den skulle vara på grund av enbart elimineringsprocesser (t.ex. metabolism, egestion) (jfr punkt 72). Testfiskens fetthalt (som är starkt kopplad till bioackumulering av hydrofoba ämnen) och fodrets fetthalt kan i praktiken variera så mycket att värdena måste korrigeras för att biomagnifikationsfaktorer ska kunna presenteras på ett meningsfullt sätt. Biomagnifikationsfaktorn bör korrigeras för utspädning på grund av tillväxt (som kinetisk BCF i vattenexponeringsmetoden) och korrigeras för fodrets fetthalt jämfört med fiskens fetthalt (korrigeringsfaktor för fetthalt). Ekvationer och exempel på sådana beräkningar finns i tillägg 5 respektive tillägg 7.

För att korrigera för utspädning på grund av tillväxt ska den tillväxtkorrigerade utsöndringskonstanten (k_{2g}) beräknas (se ekvationer i tillägg 5). Denna tillväxtkorrigerade utsöndringskonstant (k_{2g}) används sedan för att beräkna den tillväxtkorrigerade biomagnifikationsfaktorn, som i punkt 73. I vissa fall är detta tillvägagångssätt inte möjligt. Ett alternativt tillvägagångssätt som undviker behovet av korrigerig för utspädning på grund av tillväxt är att använda utsöndringsdata för massa av testämne per fisk (hela fiskar) i stället för koncentrationsdata för massa av testämne per enhetsmassa av fisk, vilket är det vanliga. Detta är enkelt att åstadkomma eftersom testerna enligt denna testmetod bör koppla registrerade vävnadskoncentrationer till enskilda fiskars längd. Det enkla förfarandet för att göra detta beskrivs i tillägg 5. Observera att k_2 fortfarande ska uppskattas och rapporteras även om detta alternativa tillvägagångssätt används.

För att korrigera för fetthalt i fodret och när en analys av fetthalten inte har utförts på all provtagningsfisk härleds de genomsnittliga fettfraktionerna (massförhållande) i fisken och i fodret (¹). Därefter beräknas korrigeringsfaktorn för fetthalt (L_f) genom att fiskens genomsnittliga fettfraktion divideras med fodrets genomsnittliga fettfraktion. Biomagnifikationsfaktorn, tillväxtkorrigerad eller ej, divideras med korrigeringsfaktorn för fetthalt för att beräkna biomagnifikationsfaktorn korrigerad för fetthalt.

Om kemiska analyser och analyser av fetthalt har utförts på samma fisk vid varje provtagningsstillfälle kan vävnadsdata korrigerade för fetthalt för enskilda fiskar användas för att direkt beräkna en BMF korrigerad för fetthalt (jfr (37)). Diagrammet för koncentrationsdata korrigerade för fetthalt ger $C_{0,d}$ baserat på fetthalt och k_2 . Därefter kan den matematiska analysen fortsätta med användning av samma ekvationer i tillägg 7, men assimileringseffektiviteten (a) beräknas med hjälp av foderintagskonstanten normaliserad för fetthalt (I_{lipid}) och foderkoncentrationen baserat på fetthalt ($C_{food-lipid}$). Parametrar korrigerade för fetthalt används sedan på ett liknande sätt för att beräkna BMF (observera att även korrigerig av tillväxtkonstanten ska tillämpas på fettfraktionen i stället för fiskens våtvikt för att beräkna BMF_{kgL} korrigerad för fetthalt och tillväxt).

Tolkning av resultaten

Den genomsnittliga tillväxten i både test- och kontrollgrupperna ska i princip inte skilja sig nämnvärt för att utesluta toxiska effekter. De två gruppernas tillväxtkonstanter eller tillväxtkurvor bör jämföras med ett lämpligt förfarande (²).

Testrapport

När undersökningen har avslutats utarbetas en slutlig rapport med information om testämne, testarter och testbetingelser enligt punkt 81 (som för metoden med exponering via vatten). Därutöver krävs följande information:

(¹) Denna metod är specifik för testet med exponering via föda och skiljer sig från det förfarande som används vid exponering via vatten. För att undvika förvirring har därför begreppet "korrigerig" använts i stället för "normalisering" – se även fotnot i punkt 106.

(²) Ett t-test av tillväxtkonstanterna kan utföras för att undersöka om tillväxten skiljer sig mellan kontroll- och testgrupperna, eller ett F-test om man analyserar variansen. Vid behov kan ett F-test eller sannolikhetsförhållandet användas som underlag för valet av lämplig tillväxtmodell (OECD monograph 54, (32)).

Testämne:

- Eventuell information om testämnets stabilitet i det beredda fodret.

Testbetingelser:

- Ämnets nominella koncentration i fodret, inblandningsteknik, mängd (fett)vehikel som använts när fodret blandas med testämnet (i förekommande fall), mätningar av testämnets koncentration i det behandlade fodret för varje analys (åtminstone i tre exemplar, innan undersökningen inleds och i slutet av upptagningsfasen) samt medelvärden.
- Om en bärarolja eller ett bärarlösningsmedel har använts för att behandla fodret, typ och kvalitet (grad, leverantör osv.)
- Använd fodertyp (ungefärlig analys ⁽¹⁾, grad eller kvalitet, leverantör osv), utfodringsintervall under upptagningsfasen, administrerad foder mängd och frekvens (inklusive eventuella justeringar baserat på provtagningsfiskens vikt).
- Den tidpunkt då fisken samlades in och avlivades för kemisk analys för varje provtagningspunkt (t.ex. en timme innan följande dags utfodring).

Resultat:

- Resultat från eventuell preliminär undersökning.
- Information om eventuella observerade negativa effekter.
- Fullständig beskrivning av alla kemiska analysförfaranden, inklusive detektions- och kvantifieringsgränser, variabilitet och återhämtning.
- Uppmätta fettkoncentrationer i fodret (behandlat foder och kontrollfoder), individuella värden, medelvärden och standardavvikelser.
- Data i tabellform om fiskens vikt (och längd), kopplade till enskilda fiskar för både kontroll- och exponeringsgrupperna (t.ex. med användning av unik identifiering av varje fisk) samt beräkningar, härledda tillväxtkonstanter och 95 % konfidensintervall.
- Data i tabellform om testämnets koncentrationer i fisken, genomsnittlig uppmätt koncentration i slutet av upptagningsfasen ($C_{0,m}$) och härledd (total) utsöndringskonstant (k_2) samt koncentration i fisken i början av utsöndringsfasen ($C_{0,d}$), tillsammans med varianserna i dessa värden (lutning och skärningspunkt).
- Data i tabellform om fiskens fetthalt (listad mot specifika ämneskoncentrationer i förekommande fall), medelvärden för test- och kontrollgruppen vid teststarten, i slutet av upptagningsfasen och i slutet av utsöndringsfasen.
- Kurvor (med alla uppmätta data) som visar följande (i förekommande fall kan koncentrationerna uttryckas i förhållande till hela kroppen eller specifika vävnader).
 - Tillväxt (dvs. fiskens vikt (och längd) som funktion av tiden) eller den naturliga logaritmen av vikten som funktion av tiden.
 - Testämnets utsöndring i fisken.
 - Den naturliga logaritmen av koncentrationen (ln-koncentration) som funktion av utsöndringstiden (inklusive den härledda upptagningskonstanten k_2 och koncentration i fisken i början av utsöndringsfasen härledd med en naturlig logaritm, $C_{0,d}$).
- Om en visuell inspektion av ett diagram visar uppenbara avvikande värden kan ett statistiskt giltigt test för avvikande värden tillämpas för att avlägsna felaktiga datapunkter. Uteslutandet av dessa värden ska dokumenteras och motiveras.

⁽¹⁾ En foderanalysteknik för protein- och fetthalt samt innehåll av råfibrer och aska. Denna information finns vanligen tillgänglig från foderleverantören.

- Beräknad tillväxtkorrigerad utsöndringskonstant och tillväxtkorrigerad halveringstid.
- Beräknad assimileringseffektivitet (α).
- "Rå" BMF för födotest, kinetisk BMF som korrigerats för fetthalt och utspädning på grund av tillväxt ("rå" och korrigerad för fetthalt baserat på hela fiskars vikt) samt vävnadsspecifik BMF i förekommande fall.
- Eventuell information om metaboliter från radioaktivt märkta testämnen och metaboliternas ackumulation.
- Eventuella anmärkningar avseende undersökning, eventuell avvikelse från förfarandet och annan relevant information.
- En sammanfattning av relevanta uppmätta och beräknade data, enligt följande:

Utsöndringskonstanter för ämnet samt biomagnifikationsfaktorer (BMF _k)	
k_g (tillväxtkonstant, dag ⁻¹):	Insatsvärde (95 % CI) ⁽¹⁾
k_2 (total utsöndringskonstant, dag ⁻¹):	Insatsvärde (95 % CI)
k_{2g} (tillväxtkorrigerad utsöndringskonstant, dag ⁻¹):	Insatsvärde (95 % CI) ⁽¹⁾
$C_{0,m}$ (uppmätt nollkoncentration i tid, koncentrationen i fisken i slutet av upptagningsfasen) (µg/g):	Insatsvärde ± SD ⁽²⁾
$C_{0,d}$ (härledd nollkoncentration i tid för utsöndringsfasen, µg/g):	Insatsvärde ± SD ⁽²⁾
I (fastställt värde för intag, g foder/g fisk/dag):	Insatsvärde
I_g (effektivt foderintervall, justerat för tillväxt, g foder/g fisk/dag) ⁽²⁾ :	Insatsvärde ± SD ⁽²⁾
C_{food} (kemisk koncentration i fodret, µg/g):	Insatsvärde ± SD ⁽²⁾
α (ämnets assimileringseffektivitet):	Insatsvärde ± SD ⁽²⁾
BMF _k kinetisk BMF för födotest):	Insatsvärde (95 % CI) ⁽¹⁾
BMF _{kg} (tillväxtkorrigerad kinetisk BMF för födotest):	Insatsvärde (95 % CI) ⁽¹⁾
$t_{1/2g}$ (tillväxtkorrigerad halveringstid i dagar):	Insatsvärde ± SD ⁽²⁾
L_c (korrigeringsfaktor för fetthalt):	Insatsvärde
BMF _{kgl} (kinetisk BMF korrigerad för fetthalt och tillväxt):	Insatsvärde
BMF _{ss-L} (indikativ stabil BMF korrigerad för fetthalt) ⁽²⁾ :	Insatsvärde ± SD ⁽²⁾

⁽¹⁾ CI: konfidensintervall (om en uppskattning är möjlig)

⁽²⁾ SD: Standardavvikelse (om en uppskattning är möjlig)

LITTERATUR

- (1) Kapitel C.13 i denna bilaga, *Biokoncentration: Genomflödesprovning med fisk*.
- (2) Kapitel A.6 i denna bilaga, *Vattenlöslighet*.
- (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) Kapitel A.8 i denna bilaga, *Fördelningskoefficient (n-oktanol/vatten): skakkolymetoden*.
- (5) Kapitel A.24 i denna bilaga, *Fördelningskoefficient (n-oktanol/vatten), HPLC-metoden*.
- (6) Kapitel A.23 i denna bilaga, *Fördelningskoefficient (n-oktanol/vatten): metod med långsam omrörning*.
- (7) Kapitel C.7 i denna bilaga, *Hydrolys som funktion av 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) Kapitel A.5 i denna bilaga, *Ytspänning i vattenlösningar*.
- (10) Kapitel A.4 i denna bilaga, *Ångtryck*.
- (11) Kapitel C.4 i denna bilaga, *Bestämning av "lätt" bionedbrytbarhet*.
- (12) Kapitel C.29 i denna bilaga, *Lätt bionedbrytbarhet – CO₂ i förslutna kärl*
- (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., Fliedner 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) Kapitel C.47 i denna bilaga, *Toxicitetstest på fisk i tidiga levnadsstadier*.
- (23) Kapitel C.15 i denna bilaga, *Fisk, korttidstest avseende toxicitet på embryo- och säckyngelstadierna*.
- (24) Kapitel C.14 i denna bilaga, *Tillväxttest på unga exemplar av fisk*.
- (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.
-

Tillägg 1

DEFINITIONER OCH ENHETER

Assimileringseffektivitet (α) är ett mått på den relativa mängd av ämnet som absorberas från tarmen in i organismen (α har ingen enhet, men uttrycks ofta som procentandel i stället för fraktion).

Bioackumulering avser vanligen en process där ämneskoncentrationen i en organism når en nivå som är högre än nivån i andningsmediet (t.ex. vatten för fisk eller luft för ett däggdjur), i födan eller i båda (1).

Biokoncentrationen är ökningen av koncentrationen av det undersökta ämnet i eller på en organism (specificerad vävnad därav) i förhållande till koncentrationen av det undersökta ämnet i omgivande medium.

Biokoncentrationsfaktorn (BCF eller K_b) vid varje tidpunkt under upptagningsfasen av ackumulationsprovet är det undersökta ämnets koncentration i/på fisken eller den specificerade vävnaden därav (C_f as mg/kg), dividerat med ämnets koncentration i omgivande medium (C_w i mg/l). BCF uttrycks som l·kg⁻¹. Observera att korrigeringarna för tillväxt och/eller standardfetthalt inte är medräknade.

Biomagnifikation är ökningen av koncentrationen av det undersökta ämnet i eller på en organism (specificerad vävnad därav) i förhållande till koncentrationen av det undersökta ämnet i fodret.

Biomagnifikationsfaktorn (BMF) är koncentrationen av ett ämne i en predator i förhållande till dess byte (eller foder) i stabilt tillstånd. I den metod som beskrivs i denna testmetod undviks exponering via vattenfasen noggrant, vilket innebär att ett BMF-värde från detta test inte kan jämföras direkt med ett BMF-värde från en fältstudie (där både exponering via vatten och föda kan kombineras).

Biomagnifikationsfaktor för test med exponering via föda (BMF för födotest) är den term som används i denna testmetod för att beskriva resultatet av kostexponeringstestet, där exponering via vattenfasen undviks noggrant. Det innebär att BMF för födotest från denna testmetod inte kan jämföras direkt med ett BMF-värde från en fältstudie (där både exponering via vatten och föda kan kombineras),

Utsöndrings- eller efterexponeringsfasen (förlustfasen) är den period, efter det att den undersökta fisken flyttats från ett medium innehållande det undersökta ämnet till ett medium fritt från detta ämne, under vilken utsöndringen (eller nettoförlusten) av det aktuella ämnet från den undersökta fisken eller specificerad vävnad därav studeras.

Utsöndringskonstanten (förlustkonstanten) (k_2) är det numeriska värdet för minskningshastigheten av koncentrationen av det undersökta ämnet i den undersökta fisken eller i specificerad vävnad därav, efter överföring av den undersökta fisken från ett medium innehållande det undersökta ämnet till ett medium fritt från detta ämne (k_2 uttrycks som dag⁻¹).

Löst organiskt kol (DOC) är ett mått på koncentrationen av kol som härrör från upplösta organiska källor i testmediet.

Exponerings- eller upptagningsfasen är den tid under vilken fisken exponeras för testämnet.

Foderintagskonstanten (I) är den genomsnittliga mängd foder som varje fisk äter varje dag, i förhållande till uppskattad genomsnittlig helfisksvikt (uttryckt i foder/g fisk/dag).

Kinetisk biokoncentrationsfaktor (BCF_k) är förhållandet mellan upptagningskonstanten, k_1 , och utsöndringskonstanten, k_2 (dvs. k_1/k_2 – se motsvarande definitioner i denna bilaga). Detta värde bör i princip vara jämförbart med BCF_{ss} (se definition ovan), men avvikelser kan förekomma om det stabila tillståndet var osäkert eller om tillväxtkorrigeringar har tillämpats på den kinetiska BCF.

Kinetisk biokoncentrationsfaktor normaliserad för fetthalt (BCF_{KL}) normaliseras till en fisk med 5 % fetthalt.

Kinetisk biokoncentrationsfaktor normaliserad för fetthalt och korrigerad för tillväxt (BCF_{kgL}) normaliseras till en fisk med 5 % fetthalt och korrigeras för tillväxt under undersökningsperioden enligt beskrivningen i tillägg 5.

Kinetisk biokoncentrationsfaktor i stabilt tillstånd normaliserad för fetthalt (BCF_{SSL}) normaliseras till en fisk med 5 % fetthalt.

Ett multikomponentämne definieras i Reach som ett ämne där fler än en huvudsaklig beståndsdel förekommer i en koncentration på 10–80 viktprocent.

Fördelningskoefficient oktanol/vatten (K_{OW}) är förhållandet då ämnets lösbarhet i n-oktanol och vatten når balans (A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)), uttrycks även som P_{OW} . Logaritmen för K_{OW} används som en indikation på ämnets potential för biokoncentration i vattenorganismer.

Partikulärt organiskt kol (POC) är ett mått på koncentrationen av kol som härrör från suspenderade organiska källor i testmediet.

Mikroextraktion i fastfas (SPME) är en analytisk metod utan lösningsmedel som har utvecklats för utspädningssystem. I denna metod exponeras en polymertäckt fiber för gas- eller vätskefasen som innehåller analyten av intresse. Normalt används en minsta analytisk tid så att jämviktsförhållanden etableras mellan de fasta och flytande faserna, med hänsyn till de mätta arterna. Därefter kan koncentrationen av analyten av intresse bestämmas direkt från fibern eller efter det att den extraherats från fibern till ett lösningsmedel, beroende på bestämningsteknik.

Stabilt tillstånd nås när mängden undersökt ämne i fisk (C_f) i den tidpunkt där kurvan blir parallell med tidsaxeln och tre på varandra följande C_f -analyser, på prover tagna med intervaller på minst två dagar, ligger inom ± 20 % på de tre proverna och ingen signifikant ökning av C_f förekommer under tiden mellan den första och den sista successiva analysen. När kombinerade prover analyseras krävs minst fyra på varandra följande analyser. När de undersökta ämnena tas upp långsamt bör provtagningsintervallerna vara sju dagar.

Den stabila biokoncentrationsfaktorn (BCF_{SS}) genomgår ingen väsentlig förändring under en längre tidsperiod, om koncentrationen av det undersökta ämnet i omgivande medium är konstant under denna tidsperiod (jfr definition av stabilt tillstånd).

Totalt organiskt kol (TOC) är ett mått på koncentrationen av kol som härrör från alla organiska källor i testmediet, inklusive partiklar och upplösta källor.

Konstanten för upptagningsförhållandet (k_1) är det numeriska värde som definierar ökningshastigheten av koncentrationen av det undersökta ämnet i/på den undersökta fisken eller specificerad vävnad därav, när fisken exponeras för nämnda ämne (k_1 uttrycks som $l\ kg^{-1}\ dag^{-1}$).

Ämnena med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiskt material benämns UVCB-ämnena.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

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

LITTERATUR

- (1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. och Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624–637.

- (2) Kapitel A.8 i denna bilaga, *Fördelningskoefficient (n-oktanol/vatten): Skakkolymetoden*
 - (3) Kapitel A.24 i denna bilaga, *Fördelningskoefficient (n-oktanol/vatten), Vätskekromatografimetoden (HPLC).*
 - (4) Kapitel A.23 i denna bilaga, *fördelningskoefficient (1-oktanol/vatten): Metod med långsam omrörning*
-

Tillägg 2

TESTBETINGELSER, TESTPERIOD OCH ÖVERLEVNADSKRITERIER FÖR REKOMMENDERADE ARTER

Komponent	Koncentrations-gränsvärde
Partiklar	5 mg/l
Halt av organiskt kol	2 mg/l
Icke-joniserad ammoniak	1 µg/l
Resterande mängd klor	10 µg/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska fosforföreningar	< 50 ng/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska klorföreningar plus polyklorerade bifenyl	< 50 ng/l
Total mängd organiskt klor	< 25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arsenik	1 µg/l
Krom	1 µg/l
Kobolt	1 µg/l
Koppar	1 µg/l
Järn	1 µg/l
Bly	1 µg/l
Nickel	1 µg/l
Zink	1 µg/l
Kadmium	< 100 ng/l
Kvicksilver	< 100 ng/l
Silver	< 100 ng/l

Tillägg 3

FISKARTER SOM REKOMMENDERAS FÖR TESTNING

Rekommenderade arter	Rekommenderat temperaturområde för undersökningen (°C)	Rekommenderad total längd på det undersökta djuret (cm) ⁽²⁾
<i>Danio rerio</i> ⁽¹⁾ (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Sebrafisk	20–25	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Knölskallelöja	20–25	5,0 ± 2,0
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Karp	20–25	8,0 ± 4,0 ⁽³⁾
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck och Schlegel) 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) Blågälad solabborre	20–25	5,0 ± 2,0
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) Regnbåge	13–17	8,0 ± 4,0
<i>Gasterosteus aculeatus</i> (Teleostei, (Gasterosteidae) (Linnaeus) Storspigg	18–20	3,0 ± 1,0

⁽¹⁾ Meyer m.fl. (1)

⁽²⁾ Det bör noteras att i själva testet är vikt att föredra som mått för att härleda storlek och tillväxtkonstanter. Längd är dock ett mer praktiskt mått om fisken väljs på avstånd i början av försöket (dvs. från stampopulationen).

⁽³⁾ Detta längdintervall anges i testningsmetoder för nya kemiska ämnen osv., baserat på Japans lag om kontroll av kemiska ämnen (CSCL).

Flera söt- och saltvattenarter har använts i mindre utsträckning, t.ex.

Slätkvåkare	(<i>Leiostomus xanthurus</i>)
Sheepshead minnow (art i ordningen tandkarpar)	(<i>Cyprinodon variegatus</i>)
Silverlax	(<i>Menidia beryllina</i>)
Abborre	(<i>Cymatogaster aggregata</i>)
Sjötunga	(<i>Parophrys vetulus</i>)
Staghorn sculpin (art i familjen simpbor)	(<i>Leptocottus armatus</i>)
Storspigg	(<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
Havsabborre	(<i>Dicentrarchus labrax</i>)
Löja	(<i>Alburnus alburnus</i>)

Den sötvattenfisk som anges i ovanstående tabell är lätt att skaffa och/eller finns lätt tillgänglig under hela året, medan tillgängligheten för havs- och brackvattenarterna delvis är begränsad till respektive länder. De kan födas upp och odlas på fiskodlingar eller laboratorier under sjukdoms- och parasitkontrollerade förhållanden, så att det använda djuret är friskt och har känd stamtavla. Dessa fiskar finns tillgängliga i stora delar av världen.

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.
-

Tillägg 4

PROVTAGNINGSSCHEMAN FÖR TEST MED EXPONERING VIA VATTEN OCH FÖDA

1 Teoretiskt exempel på ett provtagningsschema för ett fullständigt biokoncentrationstest av ett ämne via vattenexponering med $\log K_{ow} = 4$.

Provtagning av fisk	Tidsschema för provtagning		Antal vattenprover ⁽¹⁾	Antal fiskar per prov ⁽¹⁾
	Längsta tänkbara provtagningsfrekvens (dagar) ⁽²⁾	Tilläggsprover (dagar) ⁽²⁾		
Upptagningsfas				
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⁾)
Utsöndringsfas				Flytta över fisken till vatten som är fritt från testämnet
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)

Provtagning av fisk	Tidsschema för provtagning		Antal vattenprover ⁽¹⁾	Antal fiskar per prov ⁽¹⁾
	Längsta tänkbara provtagningsfrekvens (dagar) ⁽²⁾	Tilläggsprover (dagar) ⁽²⁾		
Upptagningsfas				
10	14,0		2	4–8 ⁽⁵⁾
		17,5		(4+3 ⁽⁶⁾)
TOTALT				40–72 (48–80) ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Värdet inom parentes står för antal prover (vatten, fisk) som ska tas om tilläggsprovtagning görs.

⁽²⁾ Föregående uppskattning för k_2 , för $\log K_{OW}$ på 4,0 är 0,652 dagar⁻¹. Försökets totala varaktighet är fastställd till $3 \times t_{ss} = 3 \times 4,6$ dagar, dvs. 14 dagar. För uppskattning av t_{ss} , se tillägg 5.

⁽³⁾ Ta prover på vattnet när minst tre kärvolymmer har levererats.

⁽⁴⁾ Dessa fiskar provtas från stampopulationen.

⁽⁵⁾ Om större precision eller metabolismstudier är nödvändiga som kräver användning av fler fiskar, bör dessa fiskar särskilt provtas i slutet av upptagnings- och utsöndringsfaserna (jfr punkt 40).

⁽⁶⁾ Minst tre ytterligare fiskar kan krävas för analysen av fetthalt om det inte är möjligt att använda samma provtagningsfisk som för ämneskoncentrationerna i början av testet, i slutet av upptagningsfasen och i slutet av utsöndringsfasen. Observera att det i många fall är möjligt att använda endast tre kontrollfiskar (jfr punkt 56).

2. Teoretiskt exempel på ett provtagningsschema för ett bioackumulerings-test av ett ämne via föda efter en upptagningsfas på 10 dagar och en utsöndringsfas på 42 dagar.

Provtagningshändelse	Tidsschema för provtagning		Antal foderprover	Antal fiskar per prov	
	Dag i fasen	Ytterligare fiskprover?		Testgrupp	Kontrollgrupp
Upptagningsfas					
1	0	Möjlig ⁽¹⁾ ⁽²⁾	3 – testgrupp	0	5–10
			3 – kontrollgrupp ⁽¹⁾		(8–13) ⁽²⁾
1A ⁽³⁾	1–3			5–10	5–10
2	10	Ja ⁽⁴⁾	3 – testgrupp	10–15 ⁽⁴⁾	5–10
			3 – kontrollgrupp ⁽¹⁾	(13–18) ⁽⁵⁾	(8–13) ⁽⁵⁾
Utsöndringsfas					
3	1	Ja ⁽⁴⁾		10–15 ⁽⁴⁾	5–10
4	2			5–10	5–10
5	4			5–10	5–10

Provtagningshändelse	Tidsschema för provtagning		Antal foderprover	Antal fiskar per prov	
	Dag i fasen	Ytterligare fiskprover?		Testgrupp	Kontrollgrupp
Upptagningsfas					
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⁾
TOTALT				59–120 (63–126) ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾	50–110 (56–116) ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Tre foderprover från både kontroll- och testgrupperna analyseras med avseende på testämneskoncentrationer och fetthalt.

⁽²⁾ Provtagningsfisk tas från stampopulationen, vilket ska ske så sent som möjligt innan undersökningen inleds. Minst tre fiskar från stampopulationen vid teststarten ska provtas med avseende på fetthalt.

⁽³⁾ (Valfri) provtagning tidigt under upptagningsfasen ger data för beräkningen av testämnets upptag via födan. Dessa data kan jämföras med den upptagningseffektivitet som har beräknats på grundval av data från utsöndringsfasen.

⁽⁴⁾ Fem extra fiskar kan provtas för en vävnadsspecifik analys.

⁽⁵⁾ Minst tre ytterligare fiskar kan krävas för analysen av fetthalt om det inte är möjligt att använda samma provtagningsfisk som för ämneskoncentrationerna i början av testet, i slutet av upptagningsfasen och i slutet av utsöndringsfasen. Observera att det i många fall är möjligt att använda endast tre kontrollfiskar (jfr punkterna 56 och 153).

Anmärkning om tidpunkter för de olika faserna samt provtagning: Upptagningsfasen inleds med den första utfodringen med behandlat foder. En försöksdag löper från en utfodring till kort före nästa utfodring, 24 timmar senare. Det första provtagningsstillfället (1 i tabellen) bör utföras kort före den första utfodringen (t.ex. en timme). Provtagningen bör helst utföras kort före följande dags utfodring (dvs. cirka 23 timmar efter provdagens utfodring). Upptagningsfasen slutar kort före den första utfodringen med behandlat foder, när utsöndringsfasen börjar (testgruppens fiskar håller sannolikt fortfarande på att smälta det behandlade fodret under de mellanliggande 24 timmarna efter den sista utfodringen med behandlat foder). Detta innebär att provet i slutet av upptagningsfasen bör tas kort före den första utfodringen med obehandlat foder. Det första provet under utsöndringsfasen bör tas cirka 23 timmar efter den första utfodringen med obehandlat foder.

Tillägg 5

ALLMÄNNA BERÄKNINGAR

1. Inledning
2. Prediktion av upptagningsfasens längd
3. Prediktion av utsöndringsfasens längd
4. Stegvis metod: bestämning av utsöndringskonstanten (förlust) k_2
5. Stegvis metod: bestämning av upptagningskonstanten k_1 (endast vattenexponeringsmetoden)
6. Samtidig metod för beräkning av upptagningskonstanten och utsöndringskonstanten (förlust) (endast vattenexponeringsmetoden)
7. Korrigering av utspädning för kinetisk BCF och BMF
8. Normalisering av fetthalten till 5 % (endast vattenexponeringsmetoden)

1. INLEDNING

Den allmänna modellen för bioackumulering i vatten kan beskrivas i form av upptagnings- och förlustprocesser, utan hänsyn till upptagning via föda. Den differentialekvation (dC_f/dt) som beskriver förändringshastigheten för koncentrationen i fisk ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{dag}^{-1}$) anges med (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \quad [\text{Ekvation A5.1}]$$

där

k_1 = första ordningens konstant för upptagning i fisk ($\text{l} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{dag}^{-1}$)

k_2 = första ordningens konstant för utsöndring från fisk (dag^{-1})

k_g = första ordningens konstant för fiskens tillväxt ("utspädning på grund av tillväxt") (dag^{-1})

k_m = första ordningens konstant för metabolisk transformation (dag^{-1})

k_e = första ordningens konstant för fekal egestion (dag^{-1})

C_w = koncentration i vatten ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)

C_f = koncentration i fisk ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ våtvikt)

För bioackumulerande ämnen kan ett tidsviktat genomsnitt (TWA) förväntas vara den mest relevanta exponeringskoncentrationen i vatten (C_w) inom det tillåtna fluktueringsintervallet (jfr punkt 24). Ett tidsviktat genomsnitt för vattenkoncentrationen bör beräknas enligt förfarandet i tillägg 6 till testmetod C.20 (2). Observera att ln-transformationen av vattenkoncentrationen är lämplig när ett exponentiellt sönderfall mellan förnyelseperioderna förväntas, t.ex. i en semi-statisk testutformning. I ett genomflödessystem kanske ln-transformation av exponeringskoncentrationerna inte är nödvändig. Om TWA-vattenkoncentrationer härleds bör de redovisas och användas i beräkningarna.

I ett BCF-test av standardtyp kan upptagning och utsöndring beskrivas i form av första ordningens kinetiska processer.

$$\text{Upptagningstakt} = k_1 \times C_w \quad [\text{Ekvation A5.2}]$$

$$\text{Total förlusttakt} = (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \quad [\text{Ekvation A5.3}]$$

Vid stabilt tillstånd behöver man inte uppskatta tillväxt och metabolism (dvs. värdena för k_g och k_m kan inte särskiljas från noll). Upptagningskonstanten motsvarar utsöndringskonstanten. En kombination av ekvation A5.2 och ekvation A5.3 ger då följande förhållande:

$$\text{BCF} = \frac{C_f - SS}{C_w - SS} = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{Ekvation A5.4}]$$

där

C_{f-SS} = Koncentration i fisken vid stabilt tillstånd, mg kg^{-1} våtvikt)

C_{w-SS} = Koncentration i vatten vid stabilt tillstånd (mg l^{-1}).

Förhållandet k_1/k_2 kallas kinetisk BCF (BCF_k) och bör motsvara BCF i stabilt tillstånd (BCF_{ss}), som erhålls från förhållandet mellan den stabila koncentrationen i fisk och den stabila koncentrationen i vatten. Avvikelse kan dock förekomma om det stabila tillståndet var osäkert eller om tillväxtkorrigeringar har tillämpats på den kinetiska BCF. Eftersom k_1 och k_2 är konstanter behöver stabilt tillstånd inte nås för att härleda en BCF_k .

Tillägg 5 innehåller de allmänna beräkningar som behövs för bioackumuleringsmetoden med exponering via vatten och via föda. Beräkningarna grundas på dessa första ordningens ekvationer. Avsnitten 5, 6 och 8 är dock endast relevanta för vattenexponeringsmetoden, men båda metoderna finns med här eftersom de är "allmänna" tekniker. De stegvisa metoderna (avsnitten 4 och 5) och de samtidiga metoderna (avsnitt 6) möjliggör beräkning av upptagnings- och utsöndringskonstanter som används för att härleda kinetisk BCF. Den stegvisa metoden för bestämning av k_2 (avsnitt 4) är viktig för metoden med exponering via föda, eftersom den behövs för att beräkna både assimilerings effektivitet och BMF. De beräkningar som är specifika för metoden med exponering via föda anges i tillägg 7.

2. PREDIKTION AV UPPTAGNINGSFASENS LÄNGD

Innan provet påbörjas ska en uppskattning av k_2 göras, och hänsyn till hur stor del av tiden som krävs för att nå stabilitet kan inhämtas från empiriska förhållanden mellan k_2 och fördelningskoefficienten n-oktanol/vatten (K_{ow}) eller k_1 , och BCF. Man bör dock vara medveten om att ekvationerna i detta avsnitt endast gäller när upptagnings- och utsöndringsfaserna följer första ordningens kinetik. Om så uppenbart inte är fallet bör man dock inhämta råd från biostatistiker och/eller farmakokinetiker om förutsägelser av upptagningsfasen är önskvärda.

En uppskattning av k_2 (dag^{-1}) kan erhållas med flera metoder. Följande empiriska förhållanden kan t.ex. användas som ett första steg ⁽¹⁾:

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \log K_{ow} \quad (r^2 = 0,95) \quad [(3), \text{ekvation A5.5}]$$

eller

$$k_2 = \frac{k_1}{\text{BCF}} \quad [\text{Ekvation A5.6}]$$

$$\text{där } k_1 = 520 \times W^{-0,32} \text{ (för ämnen med en } \log K_{ow} > 3) \quad (r^2 = 0,85) \quad [(4), \text{Ekvation A5.7}]$$

$$\text{och } \text{BCF} = 10^{(0,910 \cdot \log K_{ow} - 1,975 \cdot \log(6,8 \cdot 10^{-7} K_{ow} + 1) - 0,786)} \quad (r^2 = 0,90) \quad [(5), \text{Ekvation A5.8}]$$

⁽¹⁾ Precis som för alla empiriska förhållanden bör man kontrollera att testämnet omfattas av förhållandets tillämpningsområde

W = vikt för behandlad fisk (gram våtvikt) i slutet av upptagningsfasen/i början av utsöndringsfasen ⁽¹⁾.

För andra relaterade förhållanden se (6). Det kan vara fördelaktigt att tillämpa mer komplicerade modeller för uppskattningen av k_2 om det t.ex. är sannolikt att betydlig metabolism kan förekomma (7) (8). Eftersom komplexiteten ökar bör man dock vara försiktigare med tolkningen av uppskattningarna. Förekomsten av nitrogrupper kan t.ex. tyda på snabb metabolism, men så är inte alltid fallet. Vid schemaläggningen av undersökningen bör man därför väga resultaten från den prediktiva metoden mot kemisk struktur och annan relevant information (t.ex. preliminära undersökningar).

Tiden för att nå en viss del av den stabila nivån kan fås genom tillämpning av så kallad k_2 -bedömning, med den allmänna kinetiska ekvationen för upptagning och utsöndring (första ordningens kinetik), med antagandet att tillväxt och metabolism är försumbara: Om signifikant tillväxt förekommer under undersökningen kommer de uppskattningar som beskrivs nedan inte att vara tillförlitliga. I ett sådant fall är det bättre att använda den tillväxtkorrigerade k_{2g} , vilket beskrivs senare (se avsnitt 7 i detta tillägg):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_w - k_2 C_f \quad [\text{Ekvation A5.9}]$$

eller om C_w är konstant:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Ekvation A5.10}]$$

När stabiliteten börjar närma sig ($t \rightarrow \infty$), kan ekvation A5.10 reduceras (jfr (9) (10)) till:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad [\text{Ekvation A5.11}]$$

eller

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \quad [\text{Ekvation A5.12}]$$

Då är $BCF \times C_w$ en approximation till koncentrationen i fisken vid stabilt tillstånd (C_{f-ss}). [Obs: samma metod kan användas för uppskattningar av en stabil BMF i testet med exponering via föda. I detta fall ersätts BCF med BMF och C_w med C_{food} , koncentration i fodret, i ovanstående ekvationer.]

Ekvation A5.10 kan skrivas om på följande sätt:

$$C_f = C_{f-ss} (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Ekvation A5.13}]$$

eller

$$\frac{C_f}{C_{f-ss}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{Ekvation A5.14}]$$

Vid användning av ekvation A5.14 kan tiden för att nå viss stabilitet förutsägas när k_2 förutbestäms med ekvation A5.5 eller A5.6.

Som riktlinje kan sägas att den statistiskt optimala längden på upptagningsfasen, för produktion av statistiskt acceptabla data (BCF_k) är den period som krävs för att kurvan över koncentrationslogaritmen för det undersökta ämnet i fisken, avsatt mot en linjär tidsaxel, till att nå minst 50-procentig stabilitet (dvs. $0,69/k_2$), men inte mer än 95-procentig stabilitet (dvs. $3,0/k_2$) (11). Om ackumuleringen går utöver 95 % stabilt tillstånd kan en beräkning av BCF_{ss} göras.

⁽¹⁾ Fiskens vikt i slutet av upptagningsfasen kan uppskattas från tidigare undersökningsdata eller kunskap om artens sannolika viktökning, från en typisk vikt vid teststarten och under en upptagningsfas med typisk varaktighet (t.ex. 28 dagar).

Tiden för att nå 80 % stabilt tillstånd är (med användning av ekvation A5.14):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{Ekvation A5.15}]$$

eller

$$t_{80} = \frac{-\ln(0,20)}{k_2} = \frac{1,6}{k_2} \quad [\text{Ekvation A5.16}]$$

Likaså är tiden för att nå 95 % stabilt tillstånd:

$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2} \quad [\text{Ekvation A5.17}]$$

Upptagningsfasens varaktighet (dvs. tiden till dess att en viss procent av stabilt tillstånd nås, t.ex. t_{80} eller t_{95}) för ett testämne med $\log K_{OW} = 4$ skulle t.ex. vara (med användning av ekvationerna A5.5, A5.16 och A5.17):

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0,652 \text{ dag}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1,6}{0,652} = 2,45 \text{ dagar (59 timmar)}$$

$$\text{eller } t_{95} = \frac{3,0}{0,652} = 4,60 \text{ dagar (110 timmar.)}$$

Alternativt kan följande uttryck användas:

$$t_{ess} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55,31 \text{ (timmar)} \quad [\text{Ekvation A5.18}]$$

kan användas för att beräkna den tid det tar tills faktiskt stabilt tillstånd (t_{ess}) uppnås (12). För ett testämne med $\log K_{OW} = 4$ resulterar detta i:

$$t_{ess} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55,31 = 121 \text{ timmar}$$

3. PREDIKTION AV UTSÖNDRINGSFASENS LÄNGD

Prediktion av den tid som krävs för att minska mängden ämne i kroppen, till en viss del av den ursprungliga koncentrationen, kan också göras med den allmänna ekvationen för upptagning och utsöndring (med första ordningens kinetik), jfr Ekvation A5.9 (1) (13).

För utsöndringsfasen antas C_w (eller C_{food} för testet med exponering via föda) vara noll. Ekvationen kan därefter reduceras till:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \quad [\text{Ekvation A5.19}]$$

eller

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \quad [\text{Ekvation A5.20}]$$

där $C_{f,0}$ är koncentrationen vid början av utsöndringsperioden.

50-procentig utsöndring nås då vid tiden (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

eller

$$t_{50} = \frac{-\ln(0,50)}{k_2} = \frac{0,693}{k_2}$$

Likaså kommer 95-procentig utsöndring att nås vid:

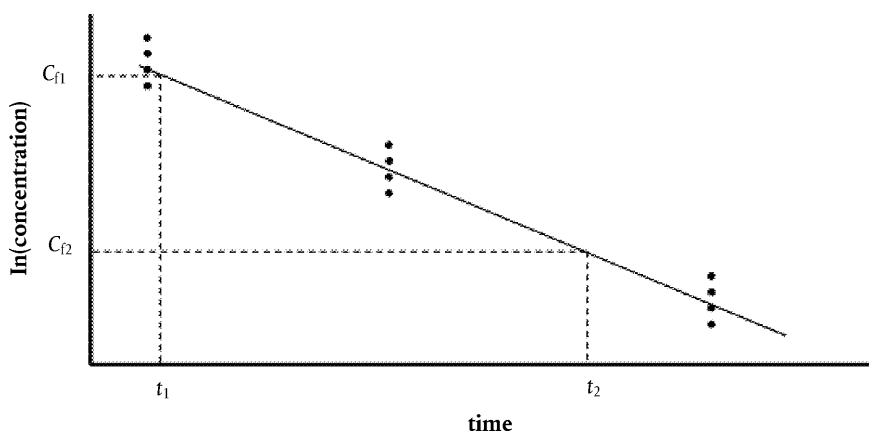
$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2}$$

Om en upptagning på 80 % används för den första perioden ($1,6/k_2$) och en 95-procentig förlust i utsöndringsfasen ($3,0/k_2$), är utsöndringsfasen ungefär dubbelt så lång som upptagningsfasen.

Observera dock att dessa beräkningar är grundade på förutsättningen att upptagnings- och utsöndringsmönstren följer första ordningens kinetik. Om det är uppenbart att första ordningens kinetik inte följs är dessa uppskattningar inte giltiga.

4. STEGVIS METOD: BESTÄMNING AV UTSÖNDRINGSKONSTANTEN (FÖRLUST) K_2

De flesta biokoncentrationsdata har förutsatts bli skäligen väl beskrivna med en enkel tvådelad modell eller tvåparametersmodell, på det sätt som visas med den rätta kurva som närmar sig punkterna för koncentrationen i fisk (på en ln-skala) under utsöndringsfasen.



Observera att avvikelser från en rät linje kan vara ett tecken på ett mer komplext utsöndringsmönster än första ordningens kinetik. Den grafiska metoden kan användas för att särskilja utsöndringstyper som avviker från första ordningens kinetik.

För att beräkna k_2 för flera provtagningstillfällen och provtagningpunkter görs en linjär regression av $\ln$ (koncentration) mot tiden. Regressionslinjens lutning är en uppskattning av utsöndringskonstanten k_2 ⁽¹⁾. Utifrån skärningspunkten är det enkelt att beräkna den genomsnittliga koncentrationen i fisken i början av utsöndringsfasen ($C_{0,d}$, som motsvarar den genomsnittliga koncentrationen i fisken i slutet av upptagningsfasen (inklusive felmarginaler) ⁽¹⁾):

$$C_{0,d} = e^{\text{intercept}}$$

[Ekvation A5.21]

⁽¹⁾ De flesta program som tillåter linjär regression ger även standardfel och konfidensintervall (CI) för uppskattningarna, t.ex. Microsoft Excel med verktygspaketet för dataanalys.

Vid beräkning av k_2 när endast två provtagningstidpunkter och provtagningspunkter finns tillgängliga (som i den minimerade utformningen) ersätts de två genomsnittliga koncentrationerna i följande ekvation:

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}) - \ln(C_{f2})}{t_2 - t_1} \quad [\text{Ekvation A5.22}]$$

Där $\ln(C_{f1})$ och $\ln(C_{f2})$ är de naturliga logaritmerna för koncentrationerna vid tidpunkterna t_1 respektive t_2 , och t_2 och t_1 är de tidpunkter då de två proven samlades in i förhållande till utsöndringsfasens början ⁽¹⁾.

5. STEGVIS METOD: BESTÄMNING AV UPPTAGNINGSKONSTANTEN k_1 (ENDAST VATTENEXPONERINGSMETODEN)

För att finna ett värde för k_1 utifrån en uppsättning koncentrationsdata sekventiella i tiden för upptagningsfasen behövs ett datorprogram som passar följande modell:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Ekvation A5.23}]$$

Om k_2 fås fram genom den föregående beräkningen är $C_f(t)$ och $C_w(t)$ koncentrationerna i fisk respektive vatten vid tidpunkten t .

För att beräkna k_1 när endast två provtagningstidpunkter och provtagningspunkter finns tillgängliga (som i den minimerade utformningen) används följande formel:

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w(1 - e^{-k_2 t})} \quad [\text{Ekvation A5.24}]$$

Om k_2 fås fram genom den föregående beräkningen är C_f koncentrationen i fisken i början av utsöndringsfasen, och C_w är den genomsnittliga koncentrationen i vattnet under upptagningsfasen ⁽²⁾.

En visuell inspektion av lutningarna för k_1 och k_2 när de avsätts mot uppmätta data vid provtagningspunkterna kan användas för att bedöma anpassningsgraden. Om det visar sig att den stegvisa metoden har gett en dålig uppskattning för k_1 bör den samtidiga metoden för att beräkna k_1 och k_2 användas (se avsnitt 6). Även här bör de resulterande lutningarna jämföras mot avsatta uppmätta data för visuell inspektion av anpassningsgraden. Om anpassningsgraden fortfarande är dålig kan det vara en indikation på att första ordningens kinetik inte gäller och mer komplexa metoder bör användas.

6. SAMTIDIG METOD FÖR BERÄKNING AV UPPTAGNINGSKONSTANTEN OCH UTSÖNDRINGSKONSTANTEN (FÖRLUST) (ENDAST VATTENEXPONERING)

Datorprogram kan användas för att finna värdena för k_1 och k_2 utifrån en uppsättning koncentrationsdata sekventiella i tiden och med följande ekvation:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{Ekvation A5.25}]$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad [\text{Ekvation A5.26}]$$

där

t_c = tidpunkten vid slutet av upptagningsfasen

⁽¹⁾ Till skillnad från den linjära regressionsmetoden ger denna formel inte ett standardfel för k_2

⁽²⁾ Till skillnad från en linjär anpassningsmetod ger denna formel vanligen inte ett standardfel eller konfidensintervall för uppskattad k_1 .

Denna metod ger direkt standardfel för uppskattningarna av k_1 och k_2 . När k_1/k_2 ersätts med BCF (jfr ekvation A5.4) i ekvationerna A5.25 och A5.26, kan även standardfelet och det 95-procentiga konfidensintervallet (CI) uppskattas. Detta är särskilt användbart vid jämförelser av uppskattningar som skiljer sig åt på grund av datatransformation. Den beroende variabeln (fiskkoncentration) kan anpassas med eller utan ln-transformation, vilket gör det möjligt att beräkna osäkerheten för den resulterande BCF.

Eftersom ett starkt samband finns mellan de två parametrarna k_1 och k_2 om de beräknas samtidigt, kan det vara tillrådligt att först beräkna k_2 från enbart utsöndringsdata (se ovan). I de flesta fall kan k_2 uppskattas i utsöndringskurvan med förhållandevis hög precision och k_1 kan därefter beräknas från upptagningsdata med icke-linjär regression ⁽¹⁾. Det rekommenderas att använda samma dataomvandling vid montering sekventiellt.

En visuell inspektion av de resulterande lutningarna när de avsätts mot uppmätta data vid provtagningspunkterna kan användas för att bedöma anpassningsgraden. Om det visar sig att denna metod har gett en dålig uppskattning för k_1 kan den samtidigt metoden för att beräkna k_1 och k_2 användas. Den anpassade modellen bör återigen jämföras mot avsatta uppmätta data för visuell inspektion av anpassningsgraden. De resulterande parameteruppskattningarna för k_1 , k_2 och BCF och deras standardfel och/eller konfidensnivåer bör jämföras mellan olika typer av anpassningar.

Om anpassningsgraden är dålig kan det vara en indikation på att första ordningens kinetik inte gäller och mer komplexa metoder bör användas. En av de vanligaste komplikationerna är fiskens tillväxt under testet.

7. KORRIGERING AV UTSPÄDNING FÖR KINETISK BCF OCH BMF

I detta avsnitt beskrivs en standardmetod för korrigering på grund av fiskens tillväxt under testet (så kallad utspädning på grund av tillväxt). Metoden är endast giltig om första ordningens kinetik gäller. Om det finns indikationer på att första ordningens kinetik inte gäller bör man inhämta råd från biostatistiker för en korrekt korrigering av utspädning på grund av tillväxt eller använda den massbaserade metod som beskrivs nedan.

I vissa fall saknar denna metod för att korrigera utspädning på grund av tillväxt tillräcklig precision och ibland fungerar den inte (för mycket långsamt utsöndrande ämnen som testas hos snabbväxande fisk kan t.ex. den härledda utsöndringskonstanten korrigerad för utspädning på grund av tillväxt, k_{2g} , vara mycket liten, vilket innebär att det fel i de två konstanter som används för att härleda den blir kritiskt, och i andra fall kan k_g -uppskattningarna bli större än k_2). I sådana fall kan en alternativ metod (dvs. den massbaserade metoden) användas, som också fungerar om första ordningens kinetik inte har följts. På så sätt behöver man inte göra korrigeringar. Denna metod beskrivs i slutet av detta avsnitt.

Metod för att subtrahera tillväxtkonstanten för tillväxtkorrigering.

I standardmetoden omvandlas alla individuella vikt- och längddata till naturliga logaritmer, och $\ln(\text{vikt})$ eller $\ln(1/\text{vikt})$ avsätts mot tid (dag), separat för behandlings- och kontrollgrupperna. Samma process utförs separat för data från upptagnings- och utsöndringsfaserna. När det gäller korrigering av utspädning på grund av tillväxt är det i allmänhet lämpligare att använda viktdata från hela undersökningen för att härleda tillväxtkonstanten (k_g), men statistiskt signifikanta skillnader mellan de tillväxtkonstanter som härletts för upptagnings- och utsöndringsfaserna kan visa att konstanten för utsöndringsfasen bör användas. Totala tillväxtkonstanter från vattenundersökningar för test- och kontrollgrupper kan användas för att kontrollera eventuella behandlingsrelaterade effekter.

⁽¹⁾ Man bör vara medveten om att osäkerheten i k_2 -uppskattningen inte används på rätt sätt i bioackumuleringsmodellen om den endast betraktas som en konstant när k_1 passas in i den stegvisa modellen. Den osäkerhet i BCF som blir resultatet kommer därför att skilja sig mellan den simultana och den stegvisa modellen

En linjär korrelation med minsta kvadratmetoden beräknas för $\ln(\text{fiskvikt})$ som funktion av dag (och för $\ln(1/\text{vikt})$ som funktion av dag) för varje grupp (test- och kontrollgrupper, individuella data, inte dagliga medelvärden) för hela undersökningen och för upptagnings- och utsöndringsfaserna med användning av statistiska standardförfaranden. Varianserna i linjernas lutningar beräknas och används för att utvärdera den statistiska signifikansen ($p = 0,05$) för skillnaden i kurvorna (tillväxtkonstanter) med Student t-test (eller ANOVA om fler än en koncentration används). Viktdata är i allmänhet att föredra för tillväxtkorrigeringar. Längddata, behandlade på samma sätt, kan vara användbara för att jämföra test- och kontrollgrupperna med avseende på behandlingsrelaterade effekter. Om det inte finns någon statistiskt signifikant skillnad i analysen av viktdata kan test- och kontrolldata slås ihop och en total tillväxtkonstant för undersökningen (k_g) beräknas som den linjära korrelationens totala lutning. Om statistiskt signifikanta skillnader observeras ska tillväxthastighetskonstanterna för varje fiskgrupp och/eller undersökningsfas redovisas separat. Tillväxtkonstanten för varje behandlad grupp används sedan för korrigering av utspädning på grund av tillväxt för den gruppen. Om statistiska skillnader mellan upptagnings- och utsöndringsfasens konstanter observerats bör de konstanter som härletts från utsöndringsfasen användas.

Den beräknade tillväxtkonstanten (k_g , uttryckt som dag^{-1}) kan subtraheras från den totala utsöndringskonstanten (k_2) för att få fram utsöndringskonstanten, k_{2g} .

$$k_{2g} = k_2 - k_g \quad [\text{Ekvation A5.27}]$$

Upptagningskonstanten divideras med den tillväxtkorrigerade utsöndringskonstanten för att få fram tillväxtkorrigerad kinetisk BCF, som benämns BCF_{k_g} (eller BMF_{k_g}).

$$\text{BCF}_{k_g} = \frac{k_1}{k_{2g}} \quad [\text{Ekvation A5.28}]$$

En tillväxtkonstant som har härletts för ett test med exponering via föda används i ekvation A7.5 för att beräkna tillväxtkorrigerad BMF_{k_g} (jfr tillägg 7).

Massbaserad metod för tillväxtkorrigering

Det finns en alternativ metod till den ovanstående metoden för att subtrahera tillväxtkonstanten för tillväxtkorrigering, där man undviker behovet av korrigera för tillväxt. Metoden används enligt följande. Principen är att använda utsöndringsdata på massbasis per hel fisk i stället för en koncentrationsbaserad metod.

Konvertera vävnadskoncentrationer från utsöndringsfasen (testämnets massa/fiskens enhetsmassa) till testämnesmassa/fiskmassa: matcha koncentrationer och längd för enskilda fiskar i tabellform (t.ex. med användning av ett datakalkylblad) och multiplicera varje koncentration med total fiskvikt för den mätningen. På så sätt får man fram en uppsättning testämnesmassa/fiskmassa för alla prover från utsöndringsfasen.

Avsätt den resulterande naturliga logaritmen för data om ämnesmassa mot tidpunkten för försöket (utsöndringsfasen) så som skulle ha gjorts normalt.

För vattenexponeringsmetoden härleds upptagningskonstanten rutinmässigt (se avsnitten 4 och 6), observera att ett "normalt" k_2 -värde bör användas i ekvationerna med anpassade kurvor för k_1) och härled utsöndringskonstanten från ovanstående data. Eftersom det resulterande värdet för utsöndringshastighetskonstanten är oberoende av tillväxt, eftersom det har härletts baserat på massa per hel fisk, bör det betecknas som k_{2g} och inte k_2 .

8. NORMALISERING AV FETTHALTEN TILL 5 % (ENDAST VATTENEXPONERINGSMETODEN)

BCF-resultat (kinetiskt och stabilt tillstånd) från vattenexponeringstester bör också redovisas i förhållande till standardvärdet för fetthalt i fisk på 5 % (våtvikt) om det inte kan hävdas att testämnet inte primärt ackumuleras i fett (t.ex. att vissa perfluorerade ämnen kan bindas till proteiner). Data om fiskkoncentration eller BCF måste omvandlas till 5 % fetthalt, våtvikt. Om samma fiskar har använts för att mäta ämneskoncentrationer och fetthalt vid alla provtagningspunkter måste varje enskild uppmätt koncentration i fisken korrigeras för det fettvärdet.

$$C_{fL} = \frac{0,05}{L} \cdot C_f \quad [\text{Ekvation A5.29}]$$

där

C_{fL} = koncentration i fisk normaliserad för fetthalt (mg kg^{-1} våtvikt)

L = fettfraktion (baserad på våtvikt)

C_f = koncentration av testämnet i fisken (mg kg^{-1} våtvikt)

Om fetthaltsanalysen inte har utförts på all provtagningsfisk används ett medelvärde för fetthalten för att normalisera BCF. För BCF i stabilt tillstånd bör man använda det medelvärde som registrerats för behandlingsgruppen i slutet av upptagningsfasen. När det gäller normalisering av en kinetisk BCF kan en annan metod krävas i vissa fall, t.ex. om fetthalten har förändrats markant under upptagnings- eller utsöndringsfasen. I alla händelser bör ett utfodringsintervall som minimerar dramatiska förändringar i fetthalten användas rutinmässigt.

$$BCF_{KL} = \frac{0,05}{L_n} \cdot BCF_K \quad [\text{Ekvation A5.30}]$$

där

BCF_{KL} = kinetisk BCF normaliserad för fetthalt (L kg^{-1})

L_n = fettfraktion (baserat på våtvikt)

BCF_K = kinetisk BCF (L kg^{-1})

LITTERATUR

- (1) Arnot J.A. och Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343–2355
- (2) Kapitel C.20 i denna bilaga, Reproduktionstest på *Daphnia magna*.
- (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.
-

Tillägg 6

AVSNITT MED EKVATIONER FÖR VATTENEXPONERINGSTESTET: MINIMERAD TESTUTFORMNING

Den logiska grunden för denna metod är att biokoncentrationsfaktorn i ett fullständigt test antingen kan bestämmas som biokoncentrationsfaktorn i stabilt tillstånd (BCF_{ss}) genom att beräkna förhållandet mellan koncentrationen av testämnet i fiskens vävnader och testämnets koncentration i vatten, eller genom att beräkna den kinetiska biokoncentrationsfaktorn (BCF_K) som förhållandet mellan upptagningshastighetskonstanten k_1 och utsöndringskonstanten k_2 . BCF_K är giltig även om ämnets koncentration inte uppnår stabilt tillstånd under upptagningsfasen, under förutsättning att upptagningen och utsöndringen sker ungefär enligt första ordningens kinetiska processer.

Om en mätning av ämneskoncentrationen i vävnader (C_{f1}) görs när exponeringsfasen avslutas (t_1) och koncentrationen i vävnaden (C_{f2}) mäts återigen efter en tid (t_2), kan utsöndringskonstanten (k_2) uppskattas med ekvation A5.22 i tillägg 5.

Upptagningskonstanten, k_1 , kan sedan bestämmas algebraiskt med hjälp av ekvation A5.23 i tillägg 5 (där C_f motsvarar C_{f1} och t motsvarar t_1) (1). Den kinetiska biokoncentrationsfaktorn för den minimerade utformningen (som benämns BCF_{Km} för att åtskilja den från kinetiska biokoncentrationsfaktorer som bestämts med andra metoder) är således:

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{Ekvation A6.1}]$$

Koncentrationerna eller resultaten bör korrigeras för tillväxt på grund av utspädning och normaliseras till en fetthalt på 5 % enligt beskrivningen i tillägg 5.

Den minimerade BCF_{ss} är den BCF som beräknas i slutet av upptagningsfasen, med antagandet att stabilt tillstånd har uppnåtts. Detta kan bara antas, eftersom antalet provtagningspunkter inte är tillräckligt för att bevisa detta.

$$\text{minimerad } BCF_{ss} = \frac{C_{f - \text{minSS}}}{C_{w - \text{minSS}}} \quad [\text{Ekvation A6.2}]$$

där

$C_{f - \text{minSS}}$ = koncentration i fisken vid antaget stabilt tillstånd i slutet av upptagningsfasen (mg kg^{-1} våtvikt),

$C_{w - \text{minSS}}$ = koncentration i vattnet vid antaget stabilt tillstånd i slutet av upptagningsfasen (mg l^{-1}).

LITTERATUR

- (1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. och Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271–2280.

Tillägg 7

AVSNITT MED EKVATIONER FÖR TEST MED EXPONERING VIA FÖDA

1. Exempel på mängder för beståndsdelar i ett lämpligt kommersiellt fiskfoder
2. Exempel på inblandningstekniker
3. Beräkning av assimilerings effektiviteten och biomagnifikationsfaktorn
4. Korrigering för fetthalt
5. Utvärdering av skillnader mellan uppmätt koncentration vid tiden noll (C₀, m) och härledd koncentration vid tiden noll (C₀, d)
6. Vägledning för mycket snabbt utsöndrande testämnen

1. EXEMPEL PÅ MÄNGDER FÖR BESTÅNDSDELAR I ETT LÄMPLIGT KOMMERSIELLT FISKFODER

Huvudbeståndsdel	Fiskmjöl
Råprotein	≤ 55,0
Råfett	≤ 15,0 % ⁽¹⁾
Växttråd	≥ 2,0
Fukt	≥ 12 %
Aska	≥ 8 %

⁽¹⁾ I vissa regioner kan det endast vara möjligt att erhålla fiskfoder med en fettkoncentration som ligger långt från denna övre gräns. I ett sådant fall bör undersökningen utföras med lägre fettkoncentration i fodret som det levereras och utfodringsintervallerna justeras på lämpligt sätt för att upprätthålla fiskens hälsa. Foderfettet bör inte ökas artificiellt med ett överskott av olja.

2. EXEMPEL PÅ INBLANDNINGSTEKNIKER

Allmänt

Kontrollfodret bör beredas på exakt samma sätt som det behandlade fodret, men utan testämnet.

För att kontrollera koncentrationen i det behandlade fodret bör tredubbla prover av det behandlade fodret extraheras med en lämplig extraktionsmetod för att mäta testämnesc koncentration eller radioaktivitet. Höga analytiska utbyten (> 85 %) med låg variation mellan proverna bör påvisas (tre provkoncentrationer för ämnet tas vid teststarten, som inte får variera mer än ± 15 % från medelvärde).

I testet med exponering via föda bör tre foderprover samlas in för analys dag 0 och i slutet av upptagningsfasen för att bestämma halten av testämne i fodret.

Beredning av fiskfoder med ett flytande testmaterial (rent)

En nominell måltestkoncentration i det behandlade fiskfodret fastställs, t.ex. 500 µg testämne/g foder. En lämplig mängd (per molmassa eller specifik radioaktivitet) av rent testämne tillsätts till en känd massa fiskfoder i ett glaskärl eller en rotationsindunstare. Massan av fiskfoder bör vara så stor att den räcker under hela upptagningsfasen (eftersom mängderna av varje foder måste ökas allteftersom fisken växer). Fiskfodret/testämnet bör blandas över natten med långsam tumling (t.ex. med en roto-rack-mixer eller en rotationsindunstare om en sådan används). Det behandlade fodret bör förvaras under förhållanden där testämnets stabilitet i foderblandningen upprätthålls (t.ex. kylning) fram till användning.

Beredning av fiskfoder med en majs- eller fiskoljevehikel

Fasta testämnen bör malas i en mortel till ett fint pulver. Flytande testämnen kan tillsättas direkt till majs eller fiskolja. Testämnet löses i en känd mängd majs eller fiskolja (t.ex. 5–15 ml). Den doserade oljan överförs kvantitativt till en rotationsindunstare av lämplig storlek. Den kolv som används för att bereda den doserade oljan sköljs med två små delar olja som sedan tillsätts rotationsindunstarens glasbehållare för att se till att allt upplöst testämne överförs. För att säkerställa fullständig upplösning/dispersion i oljan (eller om fler än ett testämne används i undersökningen) tillsätts en mikroomrörare, kolven proppas igen och blandningen ställs in på snabb omrörning över natten. En lämplig mängd fiskfoder (vanligen i pelletform) för testet tillsätts behållaren och glasbehållarens innehåll blandas homogent genom att behållaren kontinuerligt vänds i minst 30 minuter, men helst över natten. Därefter förvaras det behandlade fodret på lämpligt sätt (t.ex. i kylskåp) för att upprätthålla testämnets stabilitet i fodret fram till användning.

Beredning av fiskfoder med ett organiskt lösningsmedel

En lämplig mängd av testämnet (per molmassa eller specifik radioaktivitet), tillräcklig för att uppnå måldosen, löses upp i ett lämpligt organiskt lösningsmedel (t.ex. cyklohexan eller aceton, 10–40 ml, eller en större volym om det är nödvändigt beroende på kvaliteten på det foder som ska behandlas). Antingen en del eller alla delar (de tillsätts portionsvis) av denna lösning blandas med en tillräcklig massa fiskfoder för att uppnå testets fastställda nominella dosnivå. Fodret/testämnet kan blandas i en mixerskål av rostfritt stål. Det nydoserade fiskfodret lämnas kvar i skålen och får stå i ett dragskåp i två dagar (det ska röras om då och då) för att låta överskottet av lösningsmedel avdunsta. Det kan också blandas i en rotationsindunstare med kontinuerlig rotation. Överskottet av lösningsmedel kan "blåsas" bort under en ström av luft eller kväve om så är nödvändigt. Det är viktigt att se till att testämnet inte kristalliseras när lösningsmedlet avlägsnas. Det behandlade fodret bör förvaras under förhållanden (t.ex. kylning) där testämnets stabilitet i foderblandningen upprätthålls fram till användning.

3. BERÄKNING AV ASSIMILERINGSEFFEKTIVITETEN OCH BIOMAGNIFIKATIONSFAKTORN

För att beräkna assimileringseffektiviteten bör man först uppskatta den totala avsöndringskonstanten enligt avsnitt 4 i tillägg 5 (med den "stegvisa" metoden, dvs. den linjära standardmetoden) med användning av genomsnittliga provkoncentrationer från utsöndringsfasen. Utsöndringskonstanten, I , och upptagningsfasens varaktighet, t , är kända parametrar i undersökningen. C_{food} , den genomsnittliga uppmätta koncentrationen av testämnet i fodret, är en uppmätt variabel i undersökningen. $C_{0,d}$, testämnets koncentration i fisken i slutet av upptagningsfasen, härleds i regel från skärningspunkten i ett diagram över $\ln(\text{koncentration})$ som funktion av utsöndringsdag.

Ämnets assimileringseffektivitet (a , absorption av testämnet genom tarmen) beräknas enligt följande:

$$a = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{\text{food}}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \quad [\text{Ekvation A7.1}]$$

där

$C_{0,d}$ = härledd koncentration i fisken vid nollkoncentration i tiden för utsöndringsfasen (mg kg^{-1}),

k_2 = total (ej tillväxtkorrigerad) utsöndringskonstant (dag^{-1}), beräknad enligt ekvationerna i tillägg 5, avsnitt 3,

I = foderintagskonstant ($\text{g foder g}^{-1} \text{ fisk dag}^{-1}$),

C_{food} = koncentration i fodret ($\text{mg kg}^{-1} \text{ foder}$),

t = utfodringsperiodens varaktighet (dag)

Den utfodringskonstant, I , som används i beräkningen kan dock behöva justeras för tillväxt för att ge en korrekt assimileringseffektivitet, a . I ett test där fisken växer avsevärt under upptagningsfasen (och ingen korrigering av fodermängderna görs för att upprätthålla det fastställda utfodringsintervallet) kommer det effektiva utfodringsintervallet att vara lägre än det fastställda intervallet allteftersom upptagningsfasen fortsätter, vilket leder till en högre "reell" assimileringseffektivitet. (Observera att detta inte är av vikt för den övergripande beräkningen av BMF, eftersom I -termerna upphävs mellan ekvation A7.1 och ekvation A7.4). Den genomsnittliga utfodringskonstanten korrigerad för utspädning på grund av tillväxt, I_g , kan härledas på flera sätt, men en direkt och noggrann metod är att använda den kända tillväxtkonstanten (k_g) för att uppskatta testfiskens vikt vid olika tidpunkter under upptagningsfasen, dvs.

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g t} \quad [\text{Ekvation A7.2}]$$

där

$W_f(t)$ = genomsnittlig fiskvikt vid upptagningsfasens dag t

$W_{f,0}$ = fiskvikten vid försöksstarten

På detta sätt kan (åtminstone) fiskens genomsnittliga vikt på den sista exponeringsdagen ($W_{f,\text{end-of-uptake}}$) uppskattas. Eftersom utfodringskonstanten fastställdes baserat på $W_{f,0}$ kan den effektiva utfodringskonstanten för varje upptagningsdag beräknas med användning av dessa två viktvärden. Den tillväxtkorrigerade utfodringskonstanten, I_g ($\text{g foder g}^{-1} \text{ fisk dag}^{-1}$), som används i stället för I vid snabb tillväxt under upptagningsfasen, kan då beräknas som

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,\text{end-of-uptake}}} \quad [\text{Ekvation A7.3}]$$

När assimileringseffektiviteten har erhållits kan BMF beräknas genom att den multipliceras med utfodringskonstanten I (eller I_g , om det värdet använts för att beräkna a). Därefter divideras produkten med den totala utsöndringskonstanten k_2 :

$$BMF = \frac{I \times a}{k_2} \quad [\text{Ekvation A7.4}]$$

Den tillväxtkorrigerade biomagnifikationsfaktorn bör också beräknas på samma sätt, med användning av den tillväxtkorrigerade utsöndringskonstanten (som härleds enligt avsnitt 7 i tillägg 5). Återigen, om I_g har använts för att beräkna a , bör den även användas här i stället för I :

$$BMF = \frac{I_g \times a}{k_{2g}} \quad [\text{Ekvation A7.5}]$$

där

α = assimilerings effektivitet (absorption av testämnet genom tarmen),

k_2 = total (ej tillväxtkorrigerad) utsöndringskonstant (dag^{-1}), beräknad enligt ekvationerna i tillägg 5, avsnitt 3,

k_{2g} = tillväxtkorrigerad utsöndringskonstant (dag^{-1}),

I = foderintagskonstant ($\text{g foder g}^{-1} \text{ fisk dag}^{-1}$),

Den tillväxtkorrigerade halveringstiden ($t_{1/2}$) beräknas enligt följande:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{2g}} \quad [\text{Ekvation A7.6}]$$

Ämnets assimilerings effektivitet från födan kan också uppskattas om vävnadsrester bestäms under den linjära fasen av upptagningsfasen (mellan dag 1 och 3). I detta fall kan ämnets assimilerings effektivitet (α) bestämmas enligt följande:

$$\alpha = \frac{C_{\text{fish}}(t)}{I \times C_{\text{food}} \times t} \quad [\text{Ekvation A7.7}]$$

där

$C_{\text{fish}}(t)$ = koncentration av testämnet i fisken vid tidpunkten t (mg kg^{-1} våtvikt).

4. KORRIGERING FÖR FETTHALT

Om fetthalten mättes i samma fisk som den kemiska analysen för alla provtagningsintervall bör de individuella koncentrationerna korrigeras för fetthalt och $\ln(\text{koncentrationen, korrigerad för fetthalt})$ avsättas mot utsöndring (dag) för att få fram $C_{0,d}$ och k_2 . Assimilerings effektiviteten (ekvation A7.1) kan därefter beräknas på grundval av fetthalt, med användning av C_{food} baserat på fetthalt (dvs. C_{food} multipliceras med fodrets genomsnittliga fettfraktion). Genom en beräkning med ekvationerna A7.4 och A7.5 får man därefter direkt fram BMF korrigerad för fetthalt (samt korrigerad för utspädning på grund av tillväxt).

I annat fall härleds den genomsnittliga fettfraktionen (massförhållande) i fisken och fodret både för behandlings- och kontrollgrupperna (för foder och fisken i kontrollgruppen görs detta vanligen från data som mäts i början och slutet av exponeringsperioden, för fisken i behandlingsgruppen görs det vanligen från data som mäts endast i slutet av exponeringsperioden). I vissa undersökningar kan fiskens fetthalt öka markant. I ett sådant fall är det lämpligare att använda en genomsnittlig fettkoncentration hos testfisken som beräknats från de uppmätta värdena i slutet av exponerings- och utsöndringsfaserna. Generellt bör endast data från behandlingsgruppen användas för att härleda båda fettfraktionerna.

Korrigeringsfaktorn för fetthalt (L_c) beräknas enligt följande:

$$L_c = \frac{L_{\text{fish}}}{L_{\text{food}}} \quad [\text{Ekvation A7.8}]$$

där L_{fish} och L_{food} är de genomsnittliga fettfraktionerna i fisken respektive fodret.

Korrigeringsfaktorn för fetthalt används för att beräkna biomagnifikationsfaktorn korrigerad för fetthalt (BMF_L):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_c} \quad [\text{Ekvation A7.9}]$$

5. UTVÄRDERING AV SKILLNADER MELLAN UPPMÄTT KONCENTRATION VID TIDEN NOLL ($C_{0,m}$) OCH HÄRLEDD KONCENTRATION VID TIDEN NOLL ($C_{0,d}$)

Den uppmätta koncentrationen vid tiden noll ($C_{0,m}$) och den härledda koncentrationen vid tiden noll ($C_{0,d}$) bör jämföras. Om de är mycket lika stöder detta den modell för första ordningen som använts för att härleda utsöndringsparametrarna.

I vissa undersökningar kan det finnas en markerad skillnad mellan det härledda värdet vid tiden noll, $C_{0,d}$, och den genomsnittliga uppmätta koncentrationen vid tiden noll, $C_{0,m}$ (se sista punktsatsen i punkt 159 i denna testmetod). Om $C_{0,d}$ är mycket lägre än $C_{0,m}$ ($C_{0,d} \ll C_{0,m}$) kan skillnaden tyda på förekomst av osmält behandlat foder i tarmen. Detta kan testas experimentellt genom att en separat analys utförs på den utskurna tarmen i det fall ytterligare prover (hel fisk) togs och lagrades i slutet av upptagningsfasen. Om ett statistiskt giltigt test för avvikande värden tillämpat på utsöndringsfasens linjära regression visar att den första provtagningspunkten i utsöndringsfasen är felaktigt förhöjd, kan en linjär regression för att härleda k_2 vara lämplig, men utan den första utsöndringskoncentrationspunkten. Om osäkerheten i den linjära regressionen minskas starkt och det står klart att ungefärlig första ordningens kinetik för utsöndringen följdes, kan det vara lämpligt att använda de resulterande värdena $C_{0,d}$ och k_2 i beräkningen av assimileringseffektivitet. Detta bör vederbörligen motiveras i rapporten. Det är också möjligt att kinetik som inte är av första ordningen var verksam i utsöndringsfasen. Om detta är sannolikt (dvs. de data som omvandlats till naturliga logaritmer förefaller följa en kurva jämfört med den linjära regressionens ritade raka linje) är beräkningarna av k_2 och $C_{0,d}$ sannolikt ogiltiga och råd bör inhämtas från biostatistikern.

Om $C_{0,d}$ är mycket högre än det uppmätta värdet ($C_{0,d} \gg C_{0,m}$) kan det tyda på följande: att ämnet utsöndrades mycket snabbt (dvs. provtagningspunkterna närmade sig den analytiska metodens kvantifieringsgräns i ett mycket tidigt skede i utsöndringsfasen, jfr avsnitt 6 nedan), att det finns en avvikelse från första ordningens kinetik, att den linjära regressionen för att härleda k_2 och $C_{0,d}$ är felaktig eller att det uppstod problem med de uppmätta koncentrationerna i undersökningen vid några provtagningspunkter. I sådana fall bör diagrammet över den linjära regressionen kontrolleras för att se om det finns bevis för prover som ligger vid eller nära kvantifieringsgränsen, om avvikelser förekommer och om det finns en uppenbar kurva (vilket tyder på att första ordningens kinetik inte följdes). Detta ska redovisas i rapporten. Eventuella senare omvärderingar av den linjära regressionen för att förbättra de uppskattade värdena ska beskrivas och motiveras. Om en markerad avvikelse från första ordningens kinetik observeras är beräkningarna av k_2 och $C_{0,d}$ sannolikt ogiltiga och råd bör inhämtas från biostatistikern.

6. VÄGLEDNING FÖR MYCKET SNABBT UTSÖNDRANDE TESTÄMNEN

Såsom diskuteras i punkt 129 i testmetoden kan vissa ämnen utsöndras så snabbt att en tillförlitlig nollkoncentration i tid, $C_{0,d}$, och k_2 inte kan härledas. Detta beror på att det redan mycket tidigt i utsöndringsfasen (dvs. från det andra utsöndringsprovet och framåt) inte längre är möjligt att mäta proverna (koncentrationerna rapporteras vid kvantifieringsgränsen). Denna situation observerades för benso[a]pyren i den provningsjämförelse som utfördes som underlag för denna testmetod, och har dokumenterats i metodens valideringsrapport. I sådana fall är det inte möjligt att göra en tillförlitlig linjär regression. Den ger sannolikt en orealistiskt hög uppskattning av $C_{0,d}$, vilket leder till en skenbar assimileringseffekt som är mycket högre än 1. I dessa fall är det möjligt att beräkna en konservativ uppskattning av k_2 och en BMF med en övre gräns.

De datapunkter från utsöndringsfasen där en koncentration mättes, fram till och inklusive den första koncentration som inte detekteras (koncentration vid kvantifieringsgränsen), ger en linjär regression (med användning av koncentrationsdata som omvandlats med en naturlig logaritm mot tiden) en uppskattning av k_2 . I dessa fall kommer sannolikt endast två datapunkter att vara aktuella (t.ex. provdagarna 1 och 2 i utsöndringsfasen). Därefter kan k_2 beräknas med hjälp av ekvation A5.22 i tillägg 5. Denna k_2 -uppskattning kan användas för att uppskatta assimilerings effektiviteten enligt ekvation A7.1, genom att ersätta $C_{0,d}$ -värdet i ekvationen med uppmätt nollkoncentration i tiden ($C_{0,m}$) i fall där det står klart att $C_{0,d}$ uppskattas vara mycket högre än det värde som skulle kunna uppnås i testet. Om $C_{0,m}$ inte var mätbart bör detektionsgränsen i fiskvävnad användas. Om detta i vissa fall ger ett värde på $\alpha > 1$ antas assimilerings effektiviteten vara 1 som ett "värsta scenario".

Därefter kan högsta BMF_k uppskattas med hjälp av ekvation A7.4, och bör anges som "mycket mindre än" ($<<$) värdet. I en undersökning som har utförts med ett foderintervall på 3 %, en halveringstid för utsöndringen som är kortare än tre dagar och ett "värsta scenario" α på 1, kommer BMF_k t.ex. sannolikt vara lägre än cirka 0,13. Med tanke på syftet med denna uppskattning och det faktum att värdena kommer att vara konservativa behöver de inte korrigeras för utspädning på grund av tillväxt eller fetthalt i fisk eller foder.

Tillägg 8

**METODER FÖR ATT UPPSKATTA PRELIMINÄRA BCF FRÅN DATA SOM SAMLATS IN I STUDIEN
MED EXPONERING VIA FÖDA**

Den metod med exponering via föda som ingår i denna testmetod för testning av bioackumulering av ämnen som i praktiken inte kan testas med metoden med exponering via vatten. Vattenexponeringsmetoden ger en biokoncentrationsfaktor, medan födoexponeringsmetoden leder direkt till information om utfodringens biomagnifikationspotential. Information om biokoncentration i vatten krävs enligt många kemikaliesäkerhetssystem (t.ex. för riskbedömningar och det globalt harmoniserade systemet för klassificering och märkning av kemikalier). Därför finns det ett behov av att använda data som genereras i födostudier för att uppskatta en biokoncentrationsfaktor som är jämförbar med tester som utförs enligt vattenexponeringsmetoden ⁽¹⁾. I detta avsnitt behandlas metoder för att göra detta samt de inneboende bristerna i uppskattningarna.

Födostudien mäter utsöndring för att ge en utsöndringskonstant, k_2 . Om en upptagningskonstant kan uppskattas på grundval av tillgängliga data i en situation där fisken har exponerats för testämnet via vatten kan också en kinetisk BCF uppskattas.

Uppskattningen av en upptagningskonstant för ett testämnes vattenexponering beror på många antaganden, som i sin tur gör uppskattningen osäker. I denna uppskattningsmetod för BCF antas också att den totala utsöndringen (inklusive bidragande faktorer som fördelning i kroppen och individuella utsöndringsprocesser) är oberoende i förhållande till den exponeringsmetod som används för att få fram en kroppsbelastning för testämnet.

Uppskattningsmetodens huvudsakliga antaganden kan sammanfattas enligt följande:

Utsöndringen efter upptagning via föda är densamma som utsöndringen efter exponering via vatten för ett givet ämne.

Upptagning från vatten följer första ordningens kinetik.

Beroende på vilken metod som används för att uppskatta upptagningen kan den korreleras

- endast med fiskvikt,
- endast med ämnets fördelningskoefficient oktanol/vatten,
- med en kombination av fiskvikt och ämnets fördelningskoefficient oktanol/vatten.
- Faktorer som kan påverka upptagningen i en vattenexponeringsundersökning i praktiken, såsom ämnets biotillgänglighet, adsorption till apparater, molekylärstorlek osv. har liten effekt.
- Det viktigaste är att

den databas (övningsuppsättning) som har använts för att ta fram metoden för uppskattning av upptagning är representativ för ämnet i fråga.

I flera publikationer i den allmänt tillgängliga litteraturen har man härlett ekvationer som kopplar upptagningen från vatten i fisk via gälarna till ämnets fördelningskoefficient oktanol/vatten, fiskvikt (1) (2) (3) (4), volym och/eller fetthalt, genomträngning/diffusion i membranet (5) (6), fiskens ventilationsvolym (7) och genom en metod för flyktighet/massbalans (8) (9) (10). En detaljerad bedömning av sådana metoder ges i Crookes och Brooke (11). En publikation av Barber (12) som inriktas på modeller för bioackumulering genom upptagning via föda är också användbar i detta sammanhang eftersom den omfattar bidrag från modeller för upptagning via gälarna. En del av bakgrundsdokumentet till protokollet för exponering via föda från 2004 (13) ägnas också åt denna aspekt.

⁽¹⁾ För mycket hydrofoba ämnen är intag sannolikt den främsta exponeringsvägen i naturliga vattenmiljöer. En uppskattad BCF är därför inte helt representativ för ämnets bioackumulerande potential.

De flesta av dessa modeller verkar ha tagits fram med hjälp av begränsade databaser. För modeller där uppgifter från den databas som använts för att bygga upp modellen är tillgängliga verkar de typer av ämnen som används ofta ha en liknande struktur eller klass (funktionsmässigt, t.ex. klorerade kolväten). Detta gör det osäkert att använda en modell för att uppskatta upptagningskonstanten för en annan typ av ämne, förutom testspecifika överväganden som art, temperatur osv.

I en genomgång av tillgängliga tekniker (11) betonades att det inte finns en enda metod som är "rätt". Därför bör en tydlig motivering ges för den modell som används. Om det finns flera modeller tillgängliga som det är motiverat att använda kan det vara lämpligt att presentera flera uppskattningar av k_1 (och BCF) eller ett intervall av k_1 -värden (och BCF) enligt flera uppskattningsmetoder för upptagning. Med tanke på skillnaderna mellan modelltyperna och de datauppsättningar som har använts för att ta fram modellerna är det inte lämpligt att ta fram ett medelvärde för uppskattningar som härletts på olika sätt.

Vissa forskare har hävdats att BCF-uppskattningar av denna typ kräver en korrigering för biotillgänglighet för att ta hänsyn till ämnets adsorption till löst organiskt kol (DOC) under vattenexponeringsbetingelser. Syftet är att anpassa uppskattningen till resultaten från vattenexponeringsundersökningar (t.ex. (13) (14)). Denna korrigering är dock inte alltid lämplig med tanke på de låga nivåer av DOC som krävs i en vattenexponeringsundersökning för en uppskattning enligt det "värsta scenariot" (t.ex. förhållandet mellan ett biotillgängligt ämne och ett ämne uppmätt i lösning). För mycket hydrofoba ämnen kan upptagningen via gälarna begränsas på grund av nivån av passiv diffusion nära gälarnas yta. I detta fall kan korrigeringen ta hänsyn till denna effekt, och inte den effekt den utformades för.

I den födestudie som beskrivs här bör man fokusera på metoder som kräver indata för vilka det finns lätt tillgängliga uppgifter om de testade ämnena (dvs. $\log K_{ow}$, fiskvikt). Andra metoder som kräver mer komplexa indata kan användas, men kan kräva ytterligare mätningar i testet eller detaljerad kunskap om testämnet eller fiskarterna som kanske inte finns allmänt tillgänglig. Dessutom kan valet av modell påverkas av valideringsnivån och tillämpningsområdet (en översikt över och jämförelse av de olika metoderna ges i (11)).

Man bör tänka på att den resulterande k_1 -uppskattningen och uppskattad BCF är osäkra och kanske kräver en sammanvägd bedömning med härledd BMF och ämnesparametrar (t.ex. molekylstorlek) för en helhetsbild av ämnets bioackumuleringspotential. Tolkningen och användningen av dessa parametrar kan bero på regelverket.

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 ska kapitel C.20 ersättas med följande:

"C.20 Reproduktionstest på *Daphnia magna*

INLEDNING

Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 211 (2012). OECD:s testriktlinjer utvärderas med jämna mellanrum som en anpassning till den vetenskapliga utvecklingen. Testriktlinje 211 om reproduktionstestet härrör från testriktlinje 202, del II, Reproduktionstest på *Daphnia* sp. (1984). Det är allmänt vedertaget att data från tester som utförs enligt TG 202 kan vara variabla. Därför har ett omfattande arbete utförts för att identifiera skälen till denna variabilitet, med målet att ta fram en bättre testmetod. Testriktlinje 211 baseras på resultatet av forskning, provningsjämförelser och valideringsundersökningar som utfördes 1992 (1), 1994 (2) och 2008 (3).

De viktigaste skillnaderna mellan den ursprungliga versionen (TG 202, 1984), och den andra versionen (TG 211, 1998) är följande:

— Den rekommenderade art som ska användas är *Daphnia magna*.

— Testperiodens längd är 21 dagar.

— För semistatiska test har det antal djur som ska användas för varje testkoncentration minskats från minst 40, helst indelade i fyra grupper med tio djur, till minst tio djur som hålls individuellt (även om en annan utformning kan användas för genomflödestest).

- Rekommendationerna om testmedium och utfodringsförhållanden har gjorts mer detaljerade.
- De viktigaste skillnaderna mellan den andra versionen av testriktlinjen för reproduktionstest (TG 211, 1998) och denna version är följande:
- En beskrivning av förfaranden för identifiering av kön för nyfödda djur har lagts till i form av tillägg 7. Enligt de tidigare versionerna av denna testmetod är kön en valfri endpoint.
- Responsvariabeln antal levande avkomma producerade per överlevande föräldradjur har kompletteras med en ytterligare responsvariabel för reproduktion av *Daphnia*, dvs. totalt antal producerade levande avkomma i slutet av testet per föräldradjur i början av testet. Föräldradjur som dött oavsiktligt utesluts. Syftet med denna extra responsvariabel är att koppla den till andra reproduktionstestmetoder med ryggradslösa djur. Med hjälp av den nya responsvariabeln är det i denna testmetod dessutom möjligt att undanröja en felkälla, nämligen effekten av oavsiktliga dödsfall bland föräldradjur om sådana skulle ske under exponeringsperioden.
- Ytterligare statistisk vägledning för utformning av tester och behandling av resultat har inbegripits både för ECx (t.ex. EC₁₀ eller EC₅₀) och för NOEC-/LOEC-metoden.
- Ett toleranstest införs.

De definitioner som används finns i tillägg 1.

TESTPRINCIP

Det primära syftet med detta test är att bedöma kemikaliers verkningar på reproduktionskapaciteten hos *Daphnia magna*. Unga honor av *Daphnia* (föräldragenerationen) som är yngre än 24 timmar vid testets början exponeras för testkemikalien som tillsätts vatten i en serie koncentrationer. Testperiodens längd är 21 dagar. I slutet av testet bedöms totalt antal producerad levande avkomma. Föräldragenerationens reproduktionskapacitet kan uttryckas på andra sätt (t.ex. antalet levande avkomma som producerats per djur per dag från och med första dagen då avkomma observerades). Sådana andra sätt måste i förekommande fall rapporteras separat, utöver totalt antal levande avkomma vid testets slut. På grund av det semistatiska testets särskilda utformning jämfört med andra reproduktionstestmetoder med ryggradslösa djur är det också möjligt att räkna antalet levande avkommor som producerats av varje enskilt föräldradjur. Till skillnad från andra reproduktionstestmetoder med ryggradslösa djur är det möjligt att utesluta avkommor från föräldradjur som dött oavsiktligt under testperioden från datautvärderingen. Om föräldradjur dör i de exponerade replikaten bör man därför överväga om dödligheten följer ett koncentrations-responsmönster eller ej, t.ex. om det finns en signifikant regression i responsen jämfört med testkemikalens koncentration med en positiv kurva (här kan ett statistiskt test som Cochran-Armitages trendtest användas). Om dödligheten inte följer koncentrationsresponsens mönster bör replikat med dödlighet bland föräldradjuren undantas från analysen av testresultatet. Om dödligheten följer ett koncentrations-responsmönster bör föräldradjurens dödlighet anses utgöra en effekt av testkemikalien och replikaten bör inte undantas från analysen. Om föräldradjur dör oavsiktligt under testet, t.ex. på grund av misskötsel eller olycka eller på grund av en oförklarlig incident som inte är relaterad till testkemikalien eller visar sig vara av hankön, undantas replikatet från analysen (mer information lämnas i punkt 51). Testkemikalens toxiska effekter på reproduktionskapaciteten uttrycks som ECx genom att man passar in data i en lämplig modell genom icke-linjär regression för att uppskatta den koncentration som skulle orsaka x % minskning av reproduktionsförmågan, eller alternativt som NOEC/LOEC-värdet (4). Testkoncentrationerna ska helst ligga innanför den lägsta av de använda effektkoncentrationerna (t.ex. EC₁₀), vilket innebär att detta värde beräknas genom interpolering, inte extrapolering.

Föräldragenerationens överlevnad och tiden fram till produktion av den första satsen avkomma bör också rapporteras. Övriga kemikalierrelaterade verkningar på parametrar såsom tillväxt (t.ex. längd) och eventuellt inneboende tillväxthastighet hos populationen kan också undersökas (se punkt 44).

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

Resultat av en akut toxicitetstest (se kapitel C.2 i denna bilaga: Test av akut immobilisering av *Daphnia*-arter utfört med *Daphnia magna* kan vara användbart för att välja en lämplig grad av testkoncentrationen i reproduktions-testerna. Testkemikaliens vattenlöslighet och ångtryck ska vara kända och en tillförlitlig analysmetod ska finnas tillgänglig för kvantifiering av kemikalien i testlösningen, med rapporterad återvinningseffektivitet samt analysgräns.

Användbar information för att definiera testbetingelserna är t.ex. testkemikaliens strukturformel, kemikaliens renhet, stabilitet i ljus, stabilitet i testförhållandena, pKa, P_{ow} och resultaten från test avseende biologisk lättnedbrytbarhet (se kapitel C.4 (bestämning av biologisk lättnedbrytbarhet) och C.29 (biologisk lättnedbrytbarhet – CO₂ i förslutna kärl) i denna bilaga.

TESTETS GILTIGHET

För att ett test ska vara giltigt måste följande kriterier uppfyllas för kontrollgruppen (kontrollgrupperna):

- Föräldragenerationens mortalitet (honor av *Daphnia*) får inte överskrida 20 % vid testets slut.
- Det genomsnittliga antalet levande avkommor som har producerats per föräldradjur och som lever vid testets slut måste vara ≥ 60 .

Obs: Samma giltighetskriterium (20 %) kan användas för oavsiktlig dödlighet bland föräldradjur i kontrollerna samt för varje testkoncentration.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Utrustning

Testkärl och annan apparatur som kommer i kontakt med testämnet bör vara tillverkade uteslutande av glas eller annat kemiskt inert material. I regel används glasbägare.

Dessutom behövs åtminstone en del av följande utrustning:

- Syrgasmätare (med mikroelektrod eller annan lämplig anordning för mätning av löst syrgas i lågvolymsprover).
- Utrustning för temperaturreglering.
- pH-mätare.
- Utrustning för bestämning av vattnets hårdhetsgrad.
- Utrustning för bestämning av totalt organiskt kol (TOC) i vattnet eller utrustning för bestämning av kemisk syreförbrukning (COD).
- Apparatur för reglering av belysningen och mätning av ljusets intensitet.

Testorganism

Testet utförs på *Daphnia magna* Straus ⁽¹⁾.

Klonen ska helst identifieras med hjälp av genotypbestämning. Forskningsresultat (1) har visat att reproduktionskapaciteten hos klon A (som härrör från IRCHA i Frankrike) (5) genomgående uppfyller giltighetskriteriet som gäller ett genomsnitt på > 60 överlevande avkommor per föräldradjur vid odling i de betingelser som beskrivs i denna testmetod. Andra kloner kan godtas förutsatt att *Daphnia*-odlingen kan påvisas uppfylla giltighetskriterierna för testet.

⁽¹⁾ Andra *Daphnia*-arter kan användas förutsatt att de uppfyller tillämpliga giltighetskriterier (giltighetskriteriet för reproduktionskapaciteten i kontrollgrupperna bör vara relevant för alla arter). Om andra arter av *Daphnia* används ska de identifieras ordentligt och det ska motiveras varför de används.

Vid testets början bör djuren vara yngre än 24 timmar och får inte tillhöra den första satsen avkomma. De ska komma från en frisk stam (dvs. inte visa tecken på stress, t.ex. hög dödlighet, förekomst av hanar och ephippier, fördröjd produktion av första kullen avkomma, missfärgade djur osv.). Stamdjuren bör hållas vid samma odlingsbetingelser (ljus, temperatur, medium, utfodring och djur per volymenhet) som används vid testet. Om annat än normalt odlingsmedium för *Daphnia* används vid testet är det tillrådligt med en aklimatiseringsperiod på i regel cirka tre veckor (dvs. en generation) innan testets inleds, för att undvika stress på föräldragenerationen.

Testmedium

För testet rekommenderas ett fullständigt definierat medium. Avsaknaden av tillsatser (t.ex. alger, jordextrakt) som är svåra att karakterisera möjliggör bättre standardisering mellan laboratorier. Elendt M4- (6) och M7-medier (se tillägg 2) har konstaterats vara lämpliga för ändamålet. Andra medier (t.ex. (7) och (8)) kan godtas förutsatt att det kan visas att utförandet av *Daphnia*-odlingen uppfyller giltighetskriterierna för testet.

Vid användning av medier som innehåller icke definierade tillsatser ska dessa tillsatser klart specificeras och uppgifter om deras sammansättning lämnas i testrapporten. Det är särskilt viktigt att ange kolhalten, eftersom kol kan utgöra ett fodertillskott. Det rekommenderas att totalt organiskt kol (TOC) och/eller kemisk syreförbrukning (COD) bestäms i en stamberedning av den organiska tillsatsen och att en uppskattning görs av hur denna påverkar TOC/COD i testmediet. TOC-nivån i mediet (dvs. före tillsats av alger) bör dessutom vara lägre än 2 mg/l (9).

Vid testning av kemikalier som innehåller metaller är det viktigt att beakta det faktum att testmediets egenskaper (t. ex. hårdhet och kelateringsförmåga) kan ha inverkan på testkemikaliens toxicitet. Därför rekommenderas ett fullständigt definierat medium. För närvarande är Elendt M4 och M7 de enda medier som veterligen är lämpliga för långtidsodling av *Daphnia magna*. Båda medierna innehåller kelatbildaren EDTA. Det finns resultat (2) som tyder på att toxiciteten hos kadmium i regel förefaller vara lägre när reproduktionstestet genomförs i M4- och M7-medier än i när det genomförs i medier som inte innehåller EDTA. M4 och M7 rekommenderas därför inte för testning av kemikalier som innehåller metaller. Likaså bör andra medier som innehåller kända kelatbildare undvikas. I fråga om metallhaltiga kemikalier kan det vara tillrådligt att använda ett alternativt medium såsom ASTM-rekonstruerat hårt sötvatten (9) som inte innehåller EDTA. Denna kombination av ASTM-rekonstruerat hårt sötvatten och algextrakt (10) är lämplig för långvarig odling av *Daphnia magna* (2).

Koncentrationen löst syre bör vara över 3 mg/l i början och under testet. pH-värdet bör ligga inom intervallet 6–9, och bör normalt inte variera med mer än 1,5 enheter inom ett test. En vattenhårdhet över 140 mg/l (som CaCO_3) rekommenderas. Test på denna nivå och över har kunnat visa en reproduktionskapacitet som uppfyller giltighetskriterierna (11) (12).

Testlösningar

Testlösningar av de valda koncentrationerna bereds i regel genom utspädning av en stamlösning. Om möjligt bör stamlösningarna helst beredas utan användning av lösningsmedel eller dispergeringsmedel. Testkemikalien blandas eller rörs i testmediet med mekaniska hjälpmedel såsom omrörning, sonikering eller andra lämpliga metoder. Testsystemen bör exponeras för koncentrationer av den testkemikalie som ska användas i undersökningen under så lång tid som krävs för att visa att stabila exponeringskoncentrationer kan upprätthållas innan testorganismerna inbegrips. Om testkemikalien är svårlös i vatten bör man följa de förfaranden som beskrivs i OECD:s vägledning om hantering av svåra ämnen (13). Man bör undvika att använda lösningsmedel eller dispergeringsmedel, men det kan i vissa fall vara nödvändigt för att framställa en stamlösning med lämplig koncentration för dosering.

En kontroll med utspädningsvatten med lämpliga replikat och, om så krävs, en lösningsmedelskontroll med lämpliga replikat bör inrättas utöver testkoncentrationerna. Endast lösningsmedel eller dispergeringsmedel som bevisat inte har signifikanta eller endast minimala effekter på responsvariabeln bör användas i testet. Exempel på lämpliga lösningsmedel (t.ex. aceton, etanol, metanol, dimetylformamid och trietylglykol) och dispergeringsmedel (t.ex. Cremophor RH40, metylcellulosa 0,01 % och HCO-40) ges i (13). Om lösningsmedel eller dispergeringsmedel används bör deras slutkoncentrationer vara högst 0,1 ml/l (13) och koncentrationen bör vara densamma i alla testkärn, förutom utspädningsvattenkontrollen. Användningen av lösningsmedel bör dock begränsas till ett minimum.

FÖRFARANDE

Exponeringsförhållanden

Löptid

Testperiodens längd är 21 dagar.

Fisktäthet

Föräldradjuren hålls individuellt, ett per testkärn, vanligen med 50–100 ml i varje kärn, om inte ett genomflödessystem är nödvändigt för testningen (för *Daphnia magna* kan mindre volymer av mediet vara möjliga, särskilt för mindre daphnider, t.ex. *Ceriodaphnia dubia*).

I vissa fall behövs större volymer med tanke på de krav som gäller för den analytiska procedur som används för bestämning av testkemikaliens koncentration, även om det för den kemiska analysen är tillåtet med pooling av replikat. Om volymer över 100 ml används måste eventuellt den dos som ges till *Daphnia* ökas för att garantera tillräcklig tillgång på foder och förenlighet med giltighetskriterierna.

Försöksdjur:

För ett semistatiskt test behövs minst 10 djur per testkoncentration och minst 10 individuellt hållna djur i kontrollserierna.

För genomflödestest har en uppdelning med 40 djur i fyra grupper om 10 djur per testkoncentration visat sig vara lämplig (1). Ett mindre antal testorganismer kan användas och man rekommenderar ett minimum på 20 djur per koncentration uppdelade i två eller flera replikat med samma antal djur (t.ex. fyra replikat med fem *Daphnia* per replikat). För test där djuren hålls i grupper är det inte möjligt att undanta eventuell avkomma från den statistiska analysen om oavsiktlig dödlighet bland föräldradjuren förekommer när reproduktionen har börjat. I dessa fall kan reproduktionsresultatet uttryckas som totalt antal levande avkomor per föräldradjur i början av testet.

Fördelningen av behandlingar och den efterföljande hanteringen av testkärnen bör vara slumpmässig. I annat fall kan man få missvisande resultat som kan tolkas som en koncentrationsrelaterad verkan. Särskilt om testenheterna hanteras i koncentrationsordning kan vissa tidsrelaterade faktorer, såsom trötthet hos personalen eller andra felfaktorer, leda till större verkningar vid de högre koncentrationerna. Om testresultaten sannolikt kommer att påverkas av omständigheter i början av testet eller av miljöbetingelser, såsom placering i laboratoriet, bör man överväga blockuppdelning.

Utfodring

Vid semistatistiskt test ges foder helst dagligen men minst tre gånger per vecka (vid byte av medium). Eventuell utspädning av exponeringskoncentrationerna genom tillsats av foder bör beaktas och undvikas så långt det är möjligt med hjälp av väl koncentrerade algsuspensioner. Avvikelser från detta (t.ex. vid genomflödestest) måste rapporteras.

Under testet bör föräldradjuret helst utfodras med levande algceller. En eller flera av följande arter kan användas: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (tidigare *Selenastrum capricornutum*) och *Desmodesmus subspicatus* (tidigare *Scenedesmus subspicatus*). Utfodringen bör grunda sig på mängden organiskt kol (C) som ges till varje föräldradjur. Forskningsresultat (14) för *Daphnia magna* har visat att det är tillräckligt med dosnivåer mellan 0,1 och 0,2 mg organiskt kol per *Daphnia* och dag för att nå upp till den mängd levande avkomma som behövs med tanke på giltighetskriterierna för testet. Dosen kan ges med konstant dosering under hela testet eller, om så önskas, med lägre dosering i början och därefter ökande dosering i takt med föräldradjurens tillväxt. I det senare fallet bör dosen ändå alltid hållas inom det rekommenderade området 0,1–0,2 mg organiskt kol per *Daphnia* och dag.

Om andra matningssätt (t.ex. antalet algceller eller ljusabsorbans) används för att kontrollera utfodringens dosnivå (av bekvämlighetsskäl, eftersom mätning av kolhalten är tidskrävande) bör varje laboratorium upprätta egna nomogram för mätningarna av algodlingens kolhalt (i tillägg 3 finns anvisningar för hur man upprättar nomogram). Nomogrammen måste ses över minst årligen, och oftare om algodlingsbetingelserna har förändrats. Ljusabsorbans har konstaterats vara en bättre metod än cellräkning när det gäller bestämning av kolhalten (15).

Algsuspensionen som används för utfodring av *Daphnia* bör vara koncentrerad, så att minimal volym algodlingsmedium överförs till testkärlen. För att höja alskoncentrationen kan man använda centrifugering med påföljande återuppslammning i *Daphnia*-odlingsmedium.

Ljus

16 timmar ljus med en intensitet som inte överskrider $15\text{--}20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ mätt vid vattenytan av kärlet. För mätinstrument som kalibrerats i lux motsvarar den rekommenderade ljusintensiteten $15\text{--}20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ för kallt vitt ljus ungefär 1 000–1 500 lux.

Temperatur

Temperaturen i testmediet bör hållas inom området 18–22 °C. Inom ett och samma försök får temperaturen om möjligt inte variera med mer än 2 °C inom de angivna gränserna (t.ex. 18–20, 19–21 eller 20–22 °C) som ett dagligt intervall. Temperaturövervakningen kan gärna ordnas med hjälp av ett extra testkärl.

Luftning

Testkärlen bör inte luftas under testet.

Testets utformning

Förtest

Vid behov utförs ett preliminärt test med t.ex. fem koncentrationer av testkemikalien och två replikat för varje testkärl och kontroll. Ytterligare information, från tester med likartade kemikalier eller från litteraturen, om akut toxicitet för *Daphnia* och/eller andra vattenorganismer kan också vara användbar för att avgöra vilka koncentrationsintervall som ska användas i det preliminära testet.

Det preliminära testet pågår i 21 dagar eller tillräckligt länge för att möjliggöra tillförlitliga förutsägelser av effektnivåerna. Reproduktionen bedöms i slutet av testet. Antalet föräldradjur och förekomsten av avkomma bör registreras.

Definitivt test

Normalt bör minst fem testkoncentrationer användas som ligger innanför intervallet för effektiv koncentration (t.ex. EC_x). Koncentrationerna bör ligga i en geometrisk serie med en separationsfaktor som helst inte bör överskrida 3,2. Dessutom bör ett lämpligt antal replikat användas för varje testkoncentration (se punkterna 24–25). Om färre än fem koncentrationer används måste detta motiveras. Kemikalier får inte testas i koncentrationer som överskrider löslighetsgränsen i testmediet. Innan försöket genomförs bör man överväga testets statistiska kraft. Lämpliga statistiska metoder bör användas (4). Vid valet av koncentrationsintervall bör man beakta följande:

- i) Om man bestämmer EC_x för verkningar på reproduktionskapaciteten är det tillrådligt att använda tillräckligt antal koncentrationer för att möjliggöra bestämning av EC_x med tillräcklig konfidensnivå. De testkoncentrationer som används bör helst ligga innanför uppskattad EC_x , så att EC_x påvisas genom interpolering i stället för extrapolering. För den efterföljande statistiska analysen är det en fördel att använda fler testkoncentrationer (t.ex. tio) och färre replikat av varje koncentration (t.ex. fem, så att antalet testkärl hålls konstant) med tio kontroller.
- ii) Vid beräkning av LOEC och/eller NOEC ska den lägsta testkoncentrationen vara tillräckligt låg så att reproduktionskapaciteten vid denna koncentration inte signifikant lägre än i kontrollgruppen. I annat fall bör testet upprepas med en lägre lägsta koncentration.
- iii) Vid beräkning av LOEC och/eller NOEC ska den högsta testkoncentrationen vara tillräckligt hög så att reproduktionskapaciteten vid denna koncentration är signifikant lägre än i kontrollgruppen. Om så inte är fallet bör testet upprepas med en ökad högsta koncentration, om inte den högsta erforderliga testkoncentrationen för testning av kroniska effekter (dvs. 10 mg/l) användes som högsta testkoncentration i det första testet.

Om inga effekter observeras vid den högsta koncentrationen i det preliminära testet (t.ex. vid 10 mg/l) eller om testkemikalien högst sannolikt har en låg eller ingen toxicitet eftersom den inte är toxisk för andra organismer och/eller har ett lågt eller inget upptag, kan reproduktionstestet utföras som ett toleranstest med en testkoncentration på t.ex. 10 mg/l och kontrollen. Tio replikat bör användas för både behandlings- och kontrollgrupperna. Om ett toleranstest behöver göras i ett genomflödessystem räcker det med färre replikat. Ett toleranstest gör det möjligt att visa att det inte förekommer någon statistiskt signifikant effekt vid gränskoncentrationen, men om effekter registreras krävs i regel ett fullständigt test.

Kontroller

En kontrollserie för testmediet och i förekommande fall en kontrollserie med lösnings- eller dispergeringsmedlet bör köras utöver testserierna. Kontrollseriernas lösningsmedel eller dispergeringsmedel bör ha samma koncentration som i testkemikalien. Lämpligt antal replikat bör användas (se punkterna 23–24).

I ett väl utfört test bör variationskoefficienten kring det genomsnittliga antalet levande avkommor som i kontrollgrupperna produceras per föräldradjur i regel vara 25 %. Värdet måste rapporteras i testutformningar där djuren hålls individuellt.

Förnyelse av testmediet

Frekvensen för förnyelse av testmediet beror på testkemikaliens stabilitet, men får inte underskrida tre gånger i veckan. Om resultaten från preliminära stabilitetstest (se punkt 7) visar att testkemikalien inte hålls stabil (dvs. utanför området 120–80 % av nominell koncentration eller under 80 % av uppmätt startkoncentration) under det maximala förnyelseintervallet (dvs. tre dagar) bör man överväga förnyelse med kortare intervall eller användning av genomflödestest.

Vid semistatiskt test görs förnyelse av mediet genom att en ny serie testkärll ställs i ordning och föräldradjuren överförs till de nya kärlna t.ex. med en glaspipett av lämplig diameter. Volymen medium som överförs tillsammans med *Daphnia* bör vara så liten som möjligt.

Observationer

Resultaten av de observationer som görs under testet registreras på blanketter (se exempel i tilläggen 4 och 5). Om andra mätningar krävs (se punkt 44) behövs eventuellt tilläggsobservationer.

Avkomma

Det rekommenderas att avkommorna från varje föräldradjur tas bort och räknas dagligen efter det att produktionen av avkomma har satt i gång, för att hindra avkommorna från att konsumera foder som är avsett för föräldradjuret. I test enligt denna metod behöver bara levande avkommor räknas, men förekomsten av aborterade ägg eller döda avkommor bör registreras.

Dödlighet

Mortaliteten bland föräldradjuren bör registreras, helst dagligen eller minst lika ofta som avkommorna räknas.

Övriga parametrar

Även om denna testmetod främst är avsedd för bedömning av verkningarna på reproduktionskapaciteten är det möjligt att övriga verkningar kan kvantifieras i tillräcklig grad med tanke på statistisk analys. Reproduktionskapaciteten per överlevande föräldradjur, dvs. antalet levande avkommor som produceras under testet per överlevande förälder, kan registreras. Detta kan jämföras med den huvudsakliga responsvariabeln (reproduktiv kapacitet per föräldradjur i början av testet, dvs. föräldradjur som inte oavsiktligt dog under testet). Om föräldradjur dör i de exponerade replikaten bör man överväga om dödligheten följer koncentrationsresponsens mönster eller ej, t.ex. om det finns en signifikant regression i responsen jämfört med testkemikalens koncentration med en positiv kurva (här kan ett statistiskt test som Cochran-Armitages trendtest användas). Om dödligheten inte följer koncentrationsresponsens mönster bör replikat med dödlighet bland föräldradjuren undantas från analysen av testresultatet. Om dödligheten följer ett koncentrations-responsmönster bör föräldradjurens dödlighet anses utgöra en effekt av testkemikalien och replikaten bör inte undantas från analysen av testresultatet. Tillväxtmätningar är ytterst önskvärda eftersom de ger information om eventuella subletala effekter och kan vara användbara som ett komplement till reproduktionsmåten. Mätningar av föräldradjurens längd (dvs. kroppslängd exklusive analfenan) i slutet av testet rekommenderas. Övriga parametrar som kan mätas eller beräknas är tiden fram till att den första satsen avkomma (och efterföljande satser) produceras, satsernas antal och storlek per djur, antalet aborterade satser, förekomsten av nyfödda hanar (OECD, 2008) eller ephippier och eventuellt den inneboende tillväxthastigheten (definitionen anges i tillägg 1 och identifiering av nyföddas kön beskrivs i tillägg 7).

Frekvens för analytiska bestämningar och mätningar

Syrgashalten, temperaturen, hårdheten och pH bör mätas minst en gång i veckan i färsk och gamla medier, i kontrollsatserna och i den högsta testkemikaliekoncentrationen.

Under testets gång bör testkemikalens koncentrationer bestämmas med regelbundna intervall.

Vid semistatiskt test, där testkemikalens koncentration bör hållas inom $\pm 20\%$ av den nominella koncentrationen (dvs. inom området 80–120 %, se punkterna 6, 7 och 39), rekommenderas att de högsta och lägsta testkoncentrationerna analyseras minst en gång under testets första vecka, strax efter beredningen och vid förnyelse (analyserna görs alltså på ett prov av samma lösning – när den är nyberedd och när den förnyas). Dessa bestämningar upprepas därefter minst varje vecka.

Vid test där testkemikaliens koncentration inte förväntas hållas inom $\pm 20\%$ av den nominella koncentrationen är det nödvändigt att analysera alla testkoncentrationer, när de är nyberedda och när de förnyas. Vid test där testkemikaliens uppmätta startkoncentration inte ligger inom $\pm 20\%$ av den nominella koncentrationen men det finns tillräckliga bevis på att startkoncentrationerna är repeterbara och stabila (dvs. inom området 80–120 % av startkoncentrationerna), kan de kemiska bestämningarna under testets veckorna 2 och 3 begränsas till de högsta och lägsta testkoncentrationerna. Under alla omständigheter behöver bestämning av testkemikaliens koncentration före förnyandet bara göras för ett enda replikatkärl per testämneskoncentration.

Vid genomflödestest kan man lämpligen använda samma provtagningsschema som vid semistatiska test (även om mätningen av "gammal" lösning då inte är tillämplig). Det kan dock vara tillrådligt att utöka antalet provtagningstillfällen under den första veckan (t.ex. tre mätningar) som kontroll på att testkoncentrationerna hålls stabila. Vid dessa typer av försök bör strömningshastigheten för spädningsmedel och testkemikalien kontrolleras dagligen.

Om man kan visa att testkemikaliens koncentration har hållits tillfredsställande inom $\pm 20\%$ av den nominella eller uppmätta startkoncentrationen genom hela testet kan resultaten baseras på nominella eller uppmätta startvärden. Om avvikelsen från nominell eller uppmätt startkoncentration är större än 20 % bör resultaten uttryckas i form av tidsvägda medelvärden (vägledning ges i tillägg 6).

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

Syftet med testet är att bestämma testkemikaliens effekt på reproduktionskapaciteten. Totalantalet levande avkomor per föräldradjur beräknas för varje testkärl (varje replikat). Reproduktionen kan dessutom beräknas på grundval av den överlevande föräldraorganismens produktion av levande avkomma. Den miljömässigt mest relevanta responsvariabeln är dock totalt antal levande avkomma som producerats per föräldradjur som inte dör oavsiktligt med eller utan känd orsak ⁽¹⁾ ⁽²⁾ under testet. Om föräldradjuret dör oavsiktligt under testet eller visar sig vara en hane, tas replikatet i fråga inte med i analysen. I ett sådant fall baserar sig analysen på ett reducerat antal replikat. Om föräldradjur dör i de exponerade replikaten bör man överväga om dödligheten följer ett koncentrations-responsmönster eller ej, t.ex. om det finns en signifikant regression i responsen jämfört med testkemikaliens koncentration med en positiv kurva (här kan ett statistiskt test som Cochran-Armitages trendtest användas). Om dödligheten inte följer ett koncentrations-responsmönster bör replikat med dödlighet bland föräldradjuren undantas från analysen av testresultatet. Om dödligheten följer ett koncentrations-responsmönster bör föräldradjurens dödlighet anses utgöra en effekt av testkemikalien och replikaten bör inte undantas från analysen av testresultatet.

När LOEC och NOEC eller EC_x används för att uttrycka effekterna bör man sammanfattningsvis beräkna effekten på reproduktionsförmågan genom användning av båda de responsvariabler som anges ovan, dvs.

- som totalt antal levande avkomma som producerats per föräldradjur som inte dör oavsiktligt med eller utan känd orsak under testet, och
- som antal levande avkomma producerad per överlevande föräldradjur.

Lägsta NOEC och LOEC eller EC_x -värde som beräknas med användning av någon av dessa två responsvariabler används som slutresultat.

Innan man tillämpar den statistiska analysen, t.ex. ANOVA-förfaranden, jämförelser mellan behandlings- och kontrollgrupper med Student t-testet, Dunnetts test, Williams test eller Jonckheere-Terpstra-testet av step-down-typ, bör omvandling av data övervägas om det är nödvändigt för att uppfylla kraven för det aktuella statistiska testet. Som icke-parametriska alternativ kan man överväga Dunns eller Mann-Whitneys test. 95-procentiga konfidensintervaller beräknas för medelvärden för enskilda testkärl.

⁽¹⁾ Oavsiktlig dödlighet med känd orsak: icke-kemikalielaterad dödlighet som orsakas av en oavsiktlig händelse (dvs. känd orsak).

⁽²⁾ Oavsiktlig dödlighet utan känd orsak: icke-kemikalielaterad dödlighet utan känd orsak.

Antalet överlevande föräldradjur i de obehandlade kontrollerna är ett giltighetskriterium och bör dokumenteras och redovisas. Även alla andra skadliga effekter, t.ex. onormalt beteende och toxikologiskt signifikanta resultat, bör redovisas i den slutliga rapporten.

EC_x

EC_x-värden, inklusive deras sammanhörande lägre och övre konfidensgränser, beräknas med hjälp av lämpliga statistiska metoder (t.ex. logistiska funktioner eller Weibull-funktioner, den modifierade Spearman-Kärbermetoden eller enkel interpolering). För att beräkna EC₁₀, EC₅₀ eller något annat EC_x-värde bör en regressionsanalys utföras på hela uppsättningen data.

NOEC/LOEC

Om syftet med den statistiska analysen är att bestämma NOEC/LOEC bör lämpliga statistiska metoder användas i enlighet med OECD:s dokument 54, *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (4). I allmänhet ska negativa effekter av testkemikalien jämfört med kontrollen undersökas genom en ensidig hypotesprövning vid $p \leq 0,05$.

Normalfördelning och variansens homogenitet kan testas med hjälp av ett lämpligt statistiskt test, t.ex. Shapiro-Wilks test respektive Levenes test ($p \leq 0,05$). Ensidig ANOVA och därpå följande flerjämförelsetester kan utföras. Multipla jämförelser (t.ex. Dunnetts test) eller step-down-grundade trendtester (t.ex. Williams test eller Jonckheere-Terpstra-testet av step-down-typ) kan användas för att beräkna huruvida det finns betydande skillnader ($p \leq 0,05$) mellan kontrollerna och de olika testkemikaliekoncentrationerna (välj rekommenderat test i enlighet med OECD:s vägledningsdokument 54 (4)). I annat fall kan icke-parametriska metoder (t.ex. Bonferronis U-test enligt Holm eller Jonckheere-Terpstras trendtest) användas för att bestämma NOEC och LOEC.

Toleranstest

Om ett toleranstest (jämförelse av endast ett testkärl och kontrollen) har utförts och de nödvändiga förutsättningarna för parametriska testförfaranden (normalitet, homogenitet) är uppfyllda, kan metriska responser utvärderas med hjälp av Students test (t-test). Om dessa krav inte uppfylls kan man använda t-testet med olika varians (såsom Welchs t-test) eller ett icke-parametriskt test, såsom Mann-Whitneys U-test.

För att se om det finns betydande skillnader mellan kontrollerna (kontroll samt lösningsmedels- eller dispergeringsmedelskontroll), kan replikaten för varje kontroll testas enligt beskrivningen för toleranstestet. Om man inte upptäcker betydande skillnader med dessa tester kan alla kontroll- och lösningsmedelskontrollreplikat sammanföras. I annat fall bör alla testkärl jämföras med lösningsmedelskontrollen.

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

- fysikalisk form och relevanta fysikalkemiska egenskaper,
- kemiska identifieringsuppgifter, inklusive renhetsgrad.

Testade arter:

- klonen (om den har identifierats med genotypen eller inte), leverantör eller ursprung (om uppgiften är känd) och de odlingsbetingelser som har använts. Om annan art än *Daphnia magna* har använts måste detta rapporteras och motiveras.

Testbetingelser:

- Använt testförfarande (t.ex. semistatiskt test eller genomflödestest, volym, antal *Daphnia* per liter).

- ljusperiod och ljusintensitet,
- testets utformning (t.ex. antalet replikat, antalet föräldradjur per replikat),
- detaljuppgifter om det odlingsmedium som har använts,
- i förekommande fall uppgifter om tillsatser av organiskt material och information om sammansättning, ursprung, beredningsmetod, TOC och COD för stamberedningar, uppskattning av resulterande TOC och COD i testmediet,
- detaljerad information om utfodringen, inbegripet mängd (uttryckt som mg kol per *Daphnia* per dag) och schema (t.ex. typen av foder, och i fråga om alger specifikt namn (arter) och i den mån uppgifter finns, stam och odlingsbetingelser),
- metoden för beredning av stamlösningar och förnyelsefrekvensen (i förekommande fall bör även lösnings- eller dispergeringsmedlet och dess koncentration anges).

Resultat:

- Resultaten från eventuella preliminära test gällande testkemikaliens stabilitet.
- Nominella testkoncentrationer och resultatet av alla analyser för att bestämma koncentrationen av testkemikalien i testkärlen (exempel på blankett finns i tillägg 5), metodens utvinningskapacitet och bestämningsgräns bör också rapporteras.
- Vattenkvaliteten i testkärlen (pH, temperatur och halten löst syrgas, i förekommande fall TOC eller COD och hårdhet) (exempel på blanketter finns i tillägg 4).
- En komplett förteckning över produktionen av levande avkomma per föräldradjur under testet (exempel på blankett finns i tillägg 4).
- Antalet föräldradjur som dött och den dag de dött (exempel på blankett finns i tillägg 4).
- Variationskoefficienten för kontrollgruppens reproduktionskapacitet (baserad på det totala antalet levande avkomor per föräldradjur som är vid liv vid testets slut).
- Diagram över totalt antal levande avkomma som producerats per föräldradjur i varje replikat, med undantag för föräldradjur som har dött oavsiktligen under testet, som funktion av testkemikaliens koncentration.
- I förekommande fall, ett diagram över antal levande avkomma som producerats per överlevande föräldradjur i varje replikat som funktion av testkemikaliens koncentration.
- Följande uppgifter bör också redovisas: i förekommande fall lägsta koncentration med observerad effekt (LOEC) för reproduktion, inklusive en beskrivning av använda statistiska förfaranden och uppgift om förväntad storlekseffekt som kan detekteras (en kraftanalys kan utföras innan försöket inleds för att lämna denna uppgift) samt nolleffektkoncentration i (NOEC) för reproduktion, information om vilken responsvariabel som har använts för att beräkna LOEC- och NOEC-värdet (antingen som totalt antal avkomor per moderorganism som inte oavsiktligt dog under testet eller som totalt antal levande avkomma per överlevande moderorganism) och i förekommande fall LOEC eller NOEC för dödlighet bland föräldradjur.
- I tillämpliga fall EC_x för reproduktion, konfidensintervall (t.ex. 90 % eller 95 %) och en kurva för den anpassade modell som har använts för beräkningen, lutningen hos koncentrations-responskurvan och dess standardavvikelse.
- Annan observerad eller uppmätt biologisk verkan: rapportera varje observerad eller uppmätt biologisk verkan (t.ex. föräldradjurens tillväxt) tillsammans med alla tillbörliga motiveringar.
- Motiveringar för varje avvikelse från testmetoden.

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 nr 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 nr 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 nr 54. OECD, Paris.
 - (5) Baird, D.J., m.fl. (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. Femte upplagan. 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., m.fl. (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. Köpenhamn 1988. (H. Løkke, H. Tyle och F. Bro-Rasmussen. Eds.) s. 144–148.
 - (11) Parkhurst, B.R., J.L. Forte. och G.P. och Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.*, 26: 1–8.
 - (12) Cowgill, U.M. och 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 nr 23. OECD, Paris.
 - (14) Sims, I.R., S. Watson. och 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.
-

Tillägg 1

DEFINITIONER

I denna testmetod gäller följande definitioner:

Oavsiktlig dödlighet med känd orsak: icke-kemikalierelaterad dödlighet som orsakas av en oavsiktlig händelse (dvs. känd orsak).

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Ec_x: den koncentration av testkemikalien upplöst i vatten som inom en fastställd exponeringsperiod leder till en minskning på x % av reproduktionskapaciteten hos *Daphnia*.

Oavsiktlig dödlighet utan känd orsak: icke-kemikalierelaterad dödlighet utan känd orsak.

Inneboende tillväxthastighet hos populationen: ett mått på populationens tillväxt vilket omfattar reproduktionskapacitet och åldersspecifik mortalitet (1) (2) (3). I populationer med stabilt tillstånd är värdet på detta mått noll. För växande populationer är värdet positivt och för minskande populationer är värdet negativt. Det senare är inte hållbart och leder i slutändan till utrotning.

Detektionsgräns: den lägsta koncentration som kan detekteras men inte kvantifieras.

Bestämningsgräns: den lägsta koncentration som kan mätas kvantitativt.

Lägsta koncentration med observerad effekt (LOEC): den lägsta testade koncentration vid vilken man kan fastställa att testkemikalien har en statistiskt signifikant hämmande effekt på tillväxten (vid $p < 0,05$) inom en given exponeringstid, jämfört med kontrollen. Alla testkoncentrationer ovanför LOEC bör ha skadliga verkningar som är lika stora som eller större än de verkningar som observeras vid LOEC. Om dessa två villkor inte är uppfyllda bör en fullständig förklaring ges till hur man har valt LOEC (och därmed NOEC).

Mortalitet: ett djur registreras som dött när det är orörligt, dvs. när det inte kan simma eller om man inte kan observera rörelser hos bihang eller bakkropp inom 15 sekunder efter en försiktig omrörning i testkärlet. (Eventuell annan definition som används bör rapporteras tillsammans med motsvarande hänvisning.)

Nolleffektkoncentration (No observed effect concentration, NOEC): den testkoncentration omedelbart under LOEC som inom en fastställd exponeringsperiod inte framkallar några statistiskt signifikanta verkningar ($p < 0,05$) jämfört med kontrollgruppen.

Avkomma: de unga *Daphnia* som produceras av föräldragenerationen under testets gång.

Föräldradjur: de *Daphnia*-honor som finns närvarande vid testets början och vars reproduktionskapacitet testas.

Reproduktionskapacitet: antalet levande avkommor som produceras av föräldradjur inom testperioden.

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

LITTERATUR

- (1) Wilson, E.O. och Bossert, W.H. (1971). 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, s. 532.
- (3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. och Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156–1166.

Tillägg 2

BEREDNING AV FULLSTÄNDIGT DEFINIERADE ELENDET M7- OCH M4-MEDIER

Acklimatisering till Elendt M7- och M4-medier

I vissa laboratorier har man stött på svårigheter vid direkt överföring av *Daphnia* till M4- (I) och M7-medier. En viss framgång har uppnåtts med gradvis acklimatisering, dvs. överflyttning från eget medium till 30 % Elendt, sedan till 60 % Elendt och slutligen till 100 % Elendt. Acklimatiseringsperioderna kan behöva vara upp till en månad långa.

Beredning

Spårelement

Separata stamlösningar (I) av enskilda spårelement bereds först i vatten av lämplig renhet, t.ex. avjoniserat, destillerat eller renat med omvänd osmos. Från dessa olika stamlösningar (I) bereds en andra stamlösning (II) som innehåller alla spårelement (kombinerad lösning), dvs.

Stamlösning I (enskilt ämne)	Mängd tillsatt vatten	Koncentration (relaterad till medium M4)	För beredning av den kombinerade stamlösningen II tillsätts följande mängd av stamlösning I till vattnet	
			ml/l	
	mg/l		M 4	M 7
H ₃ BO ₃	57 190	20 000-faldig	1,0	0,25
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	7 210	20 000-faldig	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-faldig	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000-faldig	1,0	0,25
SrCl ₂ · 6 H ₂ O	3 040	20 000-faldig	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-faldig	1,0	0,25
Mo Na ₂ O ₄ · 2 H ₂ O	1 260	20 000-faldig	1,0	0,25
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	335	20 000-faldig	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000-faldig	1,0	1,0
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	200	20 000-faldig	1,0	1,0
KI	65	20 000-faldig	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000-faldig	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000-faldig	1,0	1,0
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	5 000	2 000-faldig	—	—
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	1 991	2 000-faldig	—	—

Både Na₂EDTA- och FeSO₄-lösningarna bereds separat, hålls samman och sätts omedelbart i autoklav. Detta ger:

Fe-EDTA-lösning		1 000-faldig	20,0	5,0

M4- och M7-medier

M4- och M7-medier bereds med användning av stamlösning II, makronäringsämnen och vitaminer, enligt tabellen nedan.

	Mängd tillsatt vatten	Koncentration (relaterad till medium M4)	Mängd stamlösning som tillsätts för beredning av medium	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
Stamlösning II (kombinerade spårämnen)		20-faldig	50	50
Stamlösningar för makronäringsämnen (enskilt ämne)				
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	293 800	1 000-faldig	1,0	1,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	246 600	2 000-faldig	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-faldig	0,1	0,1
NaHCO_3	64 800	1 000-faldig	1,0	1,0
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$	50 000	5 000-faldig	0,2	0,2
NaNO_3	2 740	10 000-faldig	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000-faldig	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-faldig	0,1	0,1
Kombinerad vitaminstamlösning	—	10 000-faldig	0,1	0,1

Den kombinerade vitaminstamlösningen bereds genom att sätta till de tre vitaminerna till en liter vatten enligt nedan.

	mg/l			
Tiaminhydroklorid	750	10 000-faldig		
Cyanokobalamin (B_{12})	10	10 000-faldig		
Biotin	7,5	10 000-faldig		

Den kombinerade vitaminstamlösningen lagras fryst i små alikvoter. Vitaminerna sätts till medierna strax före användningen.

OBS: För att undvika utfällning av salter vid beredning av det kombinerade mediet ska man tillsätta stamlösningens alikvoter till cirka 500–800 ml avjoniserat vatten och därefter fylla upp till en liter.

OBS: Den första offentliggjorda informationen om M4-medium finns i Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25–33.

Tillägg 3

ANALYS AV TOTALT ORGANISKT KOL (TOC) OCH UPPRÄTTANDE AV NOMOGRAM FÖR TOC I ALGFODER

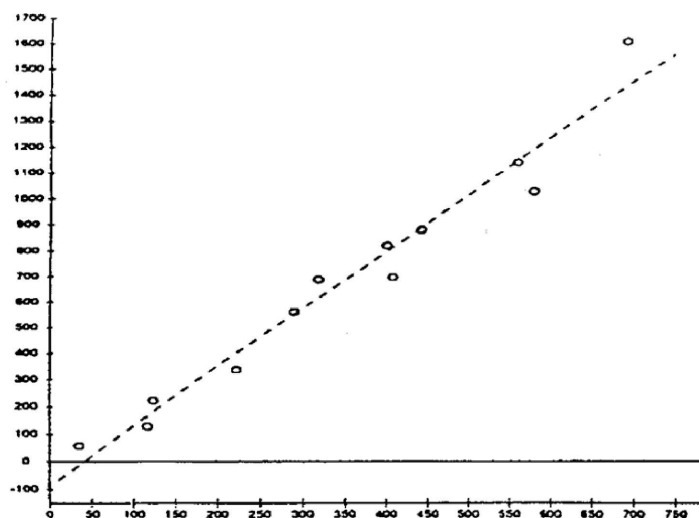
Det är allmänt känt att kolhalten i algfodret i regel inte mäts direkt utan fås genom korrelationer (nomogram) med surrogatmätningar av t.ex. antalet algceller eller ljusabsorbans.

För mätning av TOC är högttemperaturoxidation att föredra framför UV- eller persulfatmetoder. (För råd se *The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands* 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Före mätningarna för nomogrammet separeras algerna från tillväxtmediet genom centrifugering med påföljande återsuspension i destillerat vatten. För varje prov mäts surrogatparametern och TOC tre gånger. Blindprov med destillerat vatten bör analyseras och TOC-värdet härledas från det TOC-värde som erhållits för algprovet.

Nomogrammen bör vara linjära över det avsedda kolhaltområdet. Nedan visas några exempel.

OBS: Bör inte användas för omvandlingar, det är viktigt att laboratorierna tar fram egna nomogram.



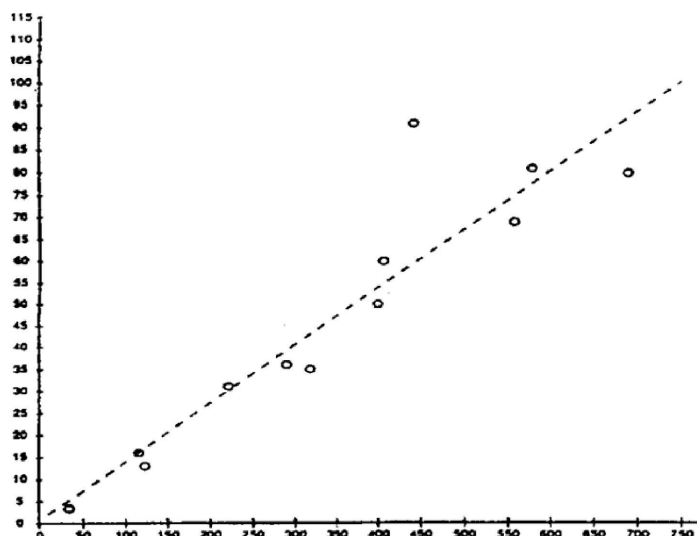
Chlorella vulgaris, var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regression av mg/l torrsvikt på mg C/l. Data från koncentrerade suspensioner av celler odlade i semistatisk sats, återuppslammade i destillerat vatten.

x-axel: mg C/l koncentrerat algfoder

y-axel: mg/l torrsvikt koncentrerat algfoder

Korrigeringskoefficient – 0,980



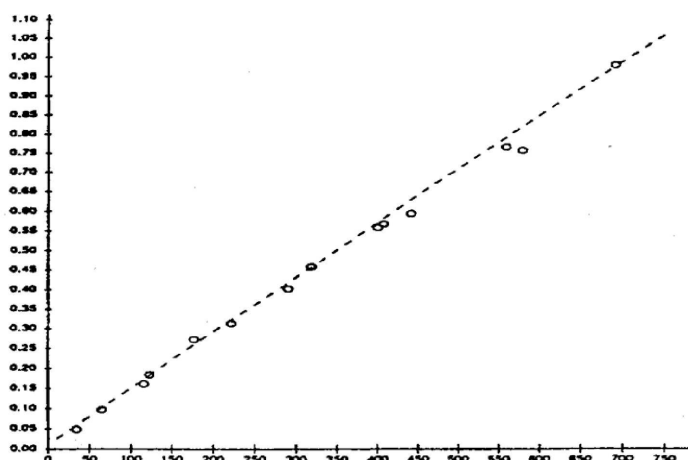
Chlorella vulgaris, var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regression av mg/l torrsvikt på mg C/1. Data från koncentrerade suspensioner av celler odlade i semistatisk sats, återuppslammade i destillerat vatten.

x-axel: mg C/1 koncentrerat algfoder

y-axel: Antal celler/1 koncentrerat algfoder

Korrigeringskoefficient -0,926



Chlorella vulgaris, var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regression av absorbans mg C/1 (1 cm väglängd). Data från koncentrerade suspensioner av celler odlade i semistatisk sats, återuppslammade i destillerat vatten.

x-axel: mg C/1 koncentrerat algfoder

y-axel: Absorbansen vid 440 nm hos en 1:10-utspädning av koncentrerat algfoder

Korrigeringskoefficient - 0,998

Tillägg 4

PROVTAGNINGSSCHEMAN FÖR TEST MED EXPONERING VIA VATTEN OCH FÖDA

Försök nr:	Startdatum:					Klon:				Medium:				Typ av foder:				Testkemikalie:					Nominell konc.:		
Dag	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21			
Mediumförnyelse (bocka för)																									
pH (*)																								ny	
																								gammal	
O ₂ (mg/l) (*)																								ny	
																								gammal	
Temp (°C) (*)																								ny	
																								gammal	
Utfordring (bocka för)																									
Antal levande avkomor (**)																									Totalt
Kärl 1																									
2																									
3																									
4																									
5																									
6																									
7																									
8																									
9																									
10																									
																								Totalt	
Kumulativ föräldramortalitet (***)																									

(*) Ange vilket kärl som användes för försöket.

(**) Markera aborterade satser med "AB" i relevant ruta.

(***) Markera varje dött föräldraexemplar med "M" i relevant ruta.

Tillägg 5

EXEMPEL PÅ BLANKETT FÖR REGISTRERING AV RESULTAT FRÅN KEMISK ANALYS

a) Uppmätta koncentrationer

[illegible]

b) Uppmätta koncentrationer uttryckta som procent av nominella koncentrationer

[illegible]

Tillägg 6

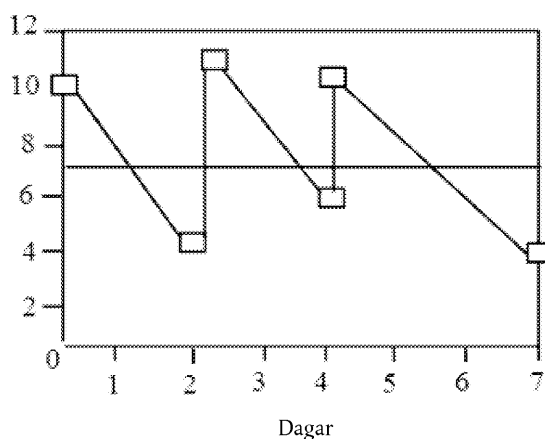
BERÄKNING AV TIDSVÄGT MEDEL VÄRDE

Tidsvägt medelvärde

Utifrån det faktum att testkemikaliens koncentration kan sjunka under perioderna mellan mediumförnyelse är det nödvändigt att överväga vilken koncentration man ska anse utgöra representativ koncentration för det koncentrationsområde som föräldragenerationen av *Daphnia* exponeras för. Valet ska basera sig på både biologiska och statistiska faktorer. Om man t.ex. tror att fortplantningen mest påverkas av den högsta koncentrationen som förekommer ska den koncentrationen användas som representativ koncentration. Om däremot ackumulerade verkningar eller långtidsverkningar av den toxiska kemikalien anses vara viktigare ska medelkoncentrationen användas. I det fallet är det lämpligt att använda tidsvägd medelkoncentration eftersom den beräknas med beaktande av de variationer som den momentana koncentrationen genomgår över tiden.

Figur 1

Exempel på tidsvägt medelvärde



I figur 1 visas ett exempel på ett (förenklat) test som omfattar 7 dagar och där mediumförnyelse görs dag 0, 2 och 4.

- Den tunna linjen som går upp och ned representerar momentana koncentrationer. Den minskade koncentrationen antas följa en exponentiell sönderfallsprocess.
- De 6 avsatta punkterna representerar observerade koncentrationer som har uppmätts vid början och slutet av varje förnyelseperiod.
- Den tjocka horisontella linjen indikerar nivån för det tidsvägda medelvärdet.

Det tidsvägda medelvärdet beräknas så, att arean under det tidsvägda medelvärdet är lika stor som arean under koncentrationskurvan. Beräkningen för exemplet i figuren ovan illustreras i tabell 1.

Tabell 1

Beräkning av tidsvägt medelvärde

Förnyelse Nr	Dagar	Konc. 0	Konc. 1	Ln (Konc. 0)	Ln (Konc. 1)	Area
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544

Förnyelse Nr	Dagar	Konc. 0	Konc. 1	Ln (Konc. 0)	Ln (Konc. 1)	Area
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Totalt antal dagar:		7			Totalarea:	50,092
					Tidsvägt medeltal:	7,156

Dagar avser antalet dagar i förnyelseperioden.

Konc 0 är den uppmätta koncentrationen vid varje förnyelseperiods början.

Konc 1 är den uppmätta koncentrationen vid varje förnyelseperiods slut.

$\ln(\textit{konc } 0)$ är den naturliga logaritmen av *Konc 0*

$\ln(\textit{konc } 1)$ är den naturliga logaritmen av *Konc 1*

Area är arean under den exponentiella kurvan för varje förnyelseperiod. Den beräknas enligt följande:

$$\textit{Area} = \frac{\textit{Konc } 0 - \textit{Konc } 1}{\ln(\textit{Konc } 0) - \ln(\textit{Konc } 1)} \times \textit{Day}$$

Det tidsvägda medelvärdet (*TW Mean*) är värdet för *Totalarea* dividerat med värdet för *Dagar* totalt.

För *Daphnia*-reproduktionstest bör tabellen utökas så att den sträcker sig över 21 dagar.

När observationer görs endast i början och slutet av varje förnyelseperiod är det uppenbart att det inte är möjligt att bekräfta att sönderfallsprocessen verkligen är exponentiell. En annorlunda kurva skulle resultera i en annorlunda beräkning av värdet för *Area*. Det är dock inte osannolikt att sönderfallsprocessen är exponentiell och därför är en sådan kurva troligen det bästa alternativet, i brist på annan information.

Däremot finns det anledning att se upp om man genom den kemiska analysen vid förnyelseperiodens slut inte lyckas få fram någon halt av kemikalien. Om det inte är möjligt att uppskatta hur snabbt kemikalien har försvunnit ur lösningen är det inte möjligt att få en realistisk *area* under kurvan, och följaktligen inte heller möjligt att få ett meningsfullt tidsvägt medelvärde.

Tillägg 7

RIKTLINJER FÖR IDENTIFIERING AV KÖN PÅ NYFÖDDA DJUR

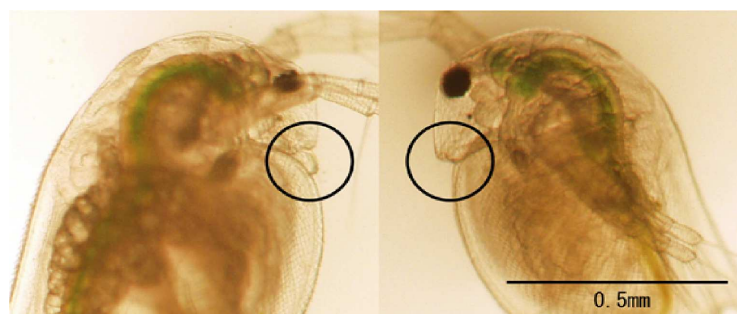
Produktion av nyfödda hanar kan uppstå under föränderliga miljöförhållanden, t.ex. förkortade fotoperioder, temperatur, minskande foderkoncentration och ökad populationstäthet (Hobaek och Larson, 1990, Kleiven m.fl., 1992). Produktion av nyfödda hanar är också en känd respons på vissa insektsmedel (Oda m.fl., 2005). Under förhållanden där kemiska stressfaktorer ger upphov till en minskning av reproduktiv avkomma från partenogenetiska honor kan ett ökat antal hanar förväntas (OECD, 2008). Enligt tillgänglig information är det inte möjligt att förutsäga vilket förhållande mellan könen eller vilken endpoint för reproduktion som är känsligast. Det finns dock vissa indikationer (se "valideringsrapporten", del 1) på att en ökning av antalet hanar kan vara mindre känslig än minskad avkomma. Eftersom det primära syftet med testmetoden är att bedöma antalet producerad avkomma är förekomsten av hanar en valfri observation. Om denna alternativa endpoint utvärderas i en undersökning bör ett ytterligare testvalideringskriterium på högst 5 % hanar användas.

Det mest praktiska och enklaste sättet att skilja mellan könen hos *Daphnia* är att använda deras fenotypiska egenskaper, eftersom hanar och honor är genetiskt identiska och könet är miljöbestämt. Hanar och honor skiljer sig åt i längd och när det gäller morfologin hos den första antennen, som är längre hos hanar än honor (fig.1). Denna skillnad är igenkännbar direkt efter födseln, även om andra sekundära könsegenskaper utvecklas när de växer (se t.ex. fig. 2 i Olmstead och LeBlanc, 2000).

För att observera morfologiskt kön bör nyfödda som producerats av varje testdjur överföras med pipett och placeras i en petriskål med testmediet. Mediet hålls till ett minimum för att begränsa djurens rörelser. Observation av den första antennen kan göras med stereomikroskop ($\times 10-60$).

Figur 1:

24-timmar gammal hane (till vänster) och hona (höger) *D. magna*. Hanar kan särskiljas från honor genom längden och morfologin hos det första sprötet enligt cirklarna (Tatarazako m.fl., 2004).



LITTERATUR

Hobaek A och 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., och 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. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), 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 ska punkt 66 i kapitel C.29 ersättas med följande:

”66. Ett test anses vara giltigt om

- a) den genomsnittliga procentuella nedbrytningen i FC-kärl (som innehåller referenskemikalie) är > 60 % senast den 14:e dagen efter inkubation, och
- b) den genomsnittliga mängden TIC i kontrollkärlen FB i slutet av testet är < 3mg C/l.

Om dessa gränsvärden inte nås, måste testet upprepas med inokulat från en annan källa och/eller testförfarandena bör ses över. Om t.ex. en hög produktion av IC i kontrollkärlen är ett problem, bör förfarandet enligt punkterna 27–32 användas.”

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

”C.47 Toxicitetstest på fisk i tidiga levnadsstadier

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 210 (2013). Tester på fisk i tidiga levnadsstadier är avsedda att definiera letala och subletala effekter av kemikalier i de stadier och arter som testas. De ger information av värde för skattningen av kemikaliens kroniska letala och subletala effekter på andra fiskarter.
2. Testriktlinje 210 baseras på ett förslag från Storbritannien. Förslaget diskuterades vid ett möte med OECD-expert i Medmenham (Storbritannien) i november 1988 och uppdaterades ytterligare 2013 för att avspegla erfarenheten från användningen av testet samt rekommendationer från en OECD-arbetsgrupp i september 2010 om testning av toxicitet för fisk (1).

TESTPRINCIP

3. Fisk i tidiga levnadsstadier exponeras för en serie koncentrationer av testkemikalien upplöst i vatten. Genomflödessystem är att föredra, men om det inte är möjligt är semistatiska system godtagbara. För närmare uppgifter bör OECD:s vägledningsdokument om akvatisk toxicitetstestning av svåra ämnen och blandningar konsulteras (2). Testet inleds med att befruktade ägg placeras i testbehållare och får fortgå under en artspecifik tidsperiod som är nödvändig för att kontrollfisken ska nå yngelstadiet. Letala och subletala effekter bedöms och jämförs med kontrollvärden för att bestämma den lägsta koncentrationen med observerad effekt (LOEC), i syfte att bestämma i) nolleffektkoncentration (NOEC) och/eller ii) EC_x (t.ex. EC_{10} , EC_{20}) med hjälp av en regressionsmodell för att uppskatta den koncentration som skulle orsaka en förändring av den uppmätta effekten på x %. Rapporteringen av relevanta effektkoncentrationer och parametrar kan bero på regelverket. EC_x bör ligga inom intervallet av testkoncentrationer så att EC_x interpoleras snarare än extrapoleras (se tillägg 1 för definitioner).

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

4. Testkemikalien avser vad som testas. Testkemikaliens vattenlöslighet (se kapitel A.6 i denna bilaga) och ångtryck (se kapitel A.4 i denna bilaga) bör vara kända och det bör finnas tillgång till en tillförlitlig analysmetod med känd och rapporterad noggrannhet och kvantifieringsgräns för att kvantifiera kemikalien i testlösningarna. Även om det inte är nödvändigt att genomföra testet kan resultaten från ett test av akut toxicitet (se kapitel C.1 eller C.49 i denna bilaga), företrädesvis med samma art som används för detta test, ge användbar information.

5. Om testmetoden används för att testa en blandning bör dess sammansättning karakteriseras så långt detta är möjligt, t.ex. genom beståndsdelarnas kemiska identitet, deras kvantitativa förekomster och deras ämnesspecifika egenskaper (såsom de som nämns ovan). Innan testmetoden för lagstadgad testning av en blandning används bör man överväga om den kommer att ge godtagbara resultat för det avsedda tillsynsändamålet.
6. Till information som bör anges hör bl.a. testämnets strukturformel, renhet, vattenlöslighet, stabilitet i vatten och ljus, pK_a , P_{ow} och resultaten från test avseende biologisk lättnedbrytbarhet (t.ex. kapitel C.4 eller C.29 i denna bilaga).

TESTETS GILTIGHET

7. För att ett test ska vara giltigt måste följande villkor uppfyllas:
 - Koncentrationen löst syre bör vara > 60 % av luftmättnadsvärdet under hela testet.
 - Under testet bör vattentemperaturen inte variera med mer än $\pm 1,5$ °C mellan olika testbehållare eller mellan påföljande dagar. Vattentemperaturen bör hållas inom de temperaturgränser som specificerats för den art som används (tillägg 2).
 - Analytisk mätning av testkoncentrationerna är obligatorisk.
 - Den totala överlevnaden för de befruktade äggen samt framgångsfrekvens efter kläckning i kontrollgrupperna och, i tillämpliga fall, i kontrollerna med lösningsmedel, måste vara större än eller lika med de gränsnivåer som anges i tillägg 2.
8. Om en mindre avvikelse från giltighetskriterierna observeras bör konsekvenserna av detta betraktas i förhållande till testuppgifternas tillförlitlighet. Dessa överväganden bör ingå i rapporten. Effekter på överlevnad, kläckning eller tillväxt som uppstår i lösningsmedelskontrollen jämfört med den negativa kontrollen ska rapporteras och diskuteras mot bakgrund av testuppgifternas tillförlitlighet.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Testbehållare

9. Alla typer av kärl av glas, rostfritt stål eller andra kemiskt inerta kärl kan användas. Eftersom det är känt att silikon har en stark absorptionsförmåga i fråga om lipofila ämnen, bör användningen av silikonrör i genomflödesstudier och silikonlock som är i kontakt med vatten minimeras genom att t.ex. använda modulglasakvarier. Kärlen bör vara tillräckligt stora för att möjliggöra ordentlig tillväxt i kontrollgruppen, underhåll av koncentrationen löst syre (för små fiskarter uppnås detta t.ex. genom en sjulitersbehållare) och efterlevnad av de kriterier för lämplig fisktäthet som anges i punkt 19. Testbehållarna ska helst placeras slumpvis i testutrymmet. En randomiserad blockutformning med en behandling per block är att föredra framför en fullständigt randomiserad utformning. Testbehållarna bör avskärmas från oönskade störningar. Testsystemet bör helst konditioneras med koncentrationer av testämnet under en tillräckligt lång tid för att uppvisa stabila exponeringskoncentrationer innan testorganismer tillsätts.

Val av art

10. Rekommenderade fiskarter anges i tabell 1. Det hindrar inte att andra arter används, men då måste testförfarandet eventuellt justeras så att lämpliga testförhållanden kan säkerställas. I ett sådant fall måste testrapporten innehålla en motivering för valet av art och testmetod.

Hållande av avelsfisk

11. Närmare uppgifter om lämplig förvaring av avelsbeståndet finns i tillägg 3 och i hänvisningarna (3), (4), (5).

Hantering av befruktade ägg, embryon och yngel

12. Fertiliserade ägg, embryon och yngel kan till en början exponeras i mindre kärl av glas eller rostfritt stål, placerade i huvudkärlet, med sidor eller ändar av nät som möjliggör ett flöde av testlösning genom kärlet. För att få ett icke-turbulent flöde genom dessa små kärl kan de hållas hängande från en arm som sänker och höjer kärnen (de får dock inte höjas över ytan). Befruktade ägg av laxfiskar kan hållas på ställningar eller galler med så stora öppningar att ynglen kan falla igenom efter kläckningen.
13. Om äggbehållare, galler eller nät har använts för att hålla äggen inom huvudkärlet tas dessa tillbehör bort efter att ynglen har kläckts, enligt vägledningen i tillägg 3, med undantag av nät som behövs för att hålla ynglen på plats. Om ynglen måste flyttas får de inte utsättas för luft, och håvar får inte användas för att släppa ut ynglen från äggbehållarna. Överföringstidpunkten varierar beroende på art och bör dokumenteras i rapporten. Det är dock inte alltid nödvändigt med en överföring.

Vatten

14. Allt vatten i vilket testarten uppvisar lämplig långsiktig överlevnad och tillväxt kan användas som testvatten (se tillägg 4). Vattnet ska hålla jämn kvalitet under hela testperioden. För att säkerställa att utspädningsvattnet inte påverkar testresultaten på oönskat sätt (t.ex. genom komplexbildning med testkemikalien) eller har skadliga verkningar på avelsbeståndets prestanda, ska vattenprover tas regelbundet för analys. Mätningar av tungmetaller (t.ex. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), viktiga anjoner och katjoner (t.ex. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), ammoniak, totala återstoden av klorhaltiga bekämpningsmedel, totala halten organiskt kol och uppslammade partiklar bör göras t.ex. halvårsvis i fall där man vet att utspädningsvattnet håller en relativt jämn kvalitet. Om man vet att vattnet är av varierande kvalitet måste mätningarna utföras oftare. Frekvensen beror på hur variabel kvaliteten är. I tillägg 4 anges ett antal kemiska egenskaper för godtagbart utspädningsvatten.

Testlösningar

15. För genomflödestest behövs ett system som kontinuerligt portionerar och späder ut en stamlösning av testkemikalien (t.ex. med mätpump, proportionalitetslösningssystem, mätnadskärssystem) för att tillföra en serie koncentrationer till testbehållarna. Stamlösningens och utspädningsvattnets flödes hastighet bör kontrolleras regelbundet under testets gång och får inte variera med mer än 10 % under hela testet. En flödes hastighet som motsvarar minst fem testbehållarvolymen per 24 timmar har konstaterats vara lämplig (3). Om den fisktäthet som anges i punkt 19 följs, är dock en lägre flödes hastighet på t.ex. 2–3 testbehållarvolymen möjlig för att förhindra att fodret försvinner snabbt.
16. Testlösningar med de valda koncentrationerna bereds genom utspädning av en stamlösning. Stamlösningen bör helst beredas genom att man helt enkelt blandar eller skakar testkemikalien i utspädningsvattnet på mekanisk väg (t.ex. omrörning och/eller ultraljud). Mätnadskolonner (löslighetskolonner) eller passiva doseringsmetoder (6) kan användas för att få en stamlösning med lämplig koncentration. Användning av lösningsmedel som bärämne rekommenderas inte. Om det är nödvändigt att använda lösningsmedel bör man införa en lösningsmedelskontroll som testas parallellt med samma lösningsmedelskoncentration som i de kemiska behandlingarna, dvs. lösningsmedelshalten bör helst vara lika i alla koncentrationer och i lösningsmedelskontrollen. För vissa utspädningssystem kan detta vara tekniskt svårt. I dessa fall bör lösningsmedelskoncentrationen i lösningsmedelskontrollen vara lika med den högsta lösningsmedelskoncentrationen i behandlingsgruppen. För ämnen som är svåra att testa bör OECD:s vägledningsdokument nr 23 om akvatisk toxicitetstestning av svåra ämnen och blandningar konsulteras (2). Om lösningsmedel används avgörs valet av lösningsmedel av ämnets kemiska egenskaper. I OECD:s vägledningsdokument nr 23 rekommenderas en maximal koncentration på 100 µl/l. För att undvika eventuella effekter av lösningsmedlet på de endpoints som mäts (7) rekommenderas en så låg koncentration av lösningsmedel som möjligt.
17. Vid semistatiskt test kan man välja mellan två olika förnyelseförfaranden. Antingen kan nya testlösningar beredas i rena kärl och de överlevande äggen och ynglen försiktigt överföras till de nya kärnen, eller så kan testorganismerna vara kvar i kärnen medan en andel (minst två tredjedelar) av testlösningen/kontrollvolymen byts ut.

FÖRFARANDE

Exponeringsförhållanden*Löptid*

18. Testet bör inledas så snart som möjligt efter det att äggen befruktats. Äggen ska helst nedsänkas i testlösningarna innan klyvningen av blastodisken inleds, eller så snart som möjligt efter denna tidpunkt. Testperiodens längd beror på den art som används. Vissa rekommendationer gällande testperiodens längd finns i tillägg 2.

Fisktäthet

19. Antalet befruktade ägg vid testperiodens början bör vara tillräckligt med tanke på statistiska krav. Äggen fördelas slumpmässigt mellan behandlingsgrupperna. För varje koncentration bör minst 80 ägg användas, jämnt fördelade mellan minst fyra likadana testbehållare per koncentration. Fisktätheten (biomassa per volym testlösning) får inte vara högre än att man kan hålla koncentrationen löst syre på minst 60 % av luftmättnadsvärdet (ASV) utan luftning under ägg- och yngelstadiet. För genomflödestest rekommenderas en fisktäthet som inte överskrider 0,5 g/l våtvikt per 24 timmar och som under inga omständigheter överskrider 5 g/l lösning (3).

Ljus och temperatur

20. Fotoperioden och vattentemperaturen bör vara anpassade för den art som testas (se tillägg 2).

Utfodring

21. Foder och utfodring är av avgörande betydelse, och det är viktigt att man vid lämpliga tidpunkter ger rätt foder för varje levnadsstadium och i en tillräckligt stor mängd för att stödja normal tillväxt. Utfodringen bör vara ungefär lika i alla replikat om mängden inte justeras för att ta hänsyn till dödlighet. Överbliven mat och avföring bör avlägsnas, om så behövs, för att undvika ackumulering av avfallsprodukter. Detaljerade utfodringssystem anges i tillägg 3, men allteftersom man vinner nya erfarenheter rationaliseras utfodrings-systemen kontinuerligt för att förbättra överlevnaden och optimera tillväxten. Levande foder utgör en källa till miljöberikning och bör därför användas i stället för eller som komplement till torkad eller fryst mat, när så är lämpligt för arten och levnadsstadiet.

Testkoncentrationer

22. I regel krävs fem koncentrationer med minst fyra replikat per koncentration och ett fast koncentrationsförhållande som inte överstiger 3,2. Om information om testning av akut toxicitet finns tillgänglig, företrädesvis med samma art och/eller ett intervallbestämmande test, bör sådana uppgifter beaktas (1) vid valet av lämpliga testkoncentrationer. Alla informationskällor bör dock övervägas vid valet av lämpliga testkoncentrationer, inklusive källor som t.ex. jämförelser med strukturlika ämnen och testdata för akut toxicitet för fiskembryon. Ett gränstest eller en utökat gränstest med färre än fem koncentrationer som definitivt test kan vara godtagbart om endast empiriska NOEC ska fastställas. Om färre än fem koncentrationer används måste detta motiveras. Testkemikaliekoncentrationer som är högre än LC₅₀ under 96 timmar eller 10 mg/l, beroende på vilken som är lägre, behöver inte testas.

Kontroller

23. En kontrollsats med utspädningsvatten och, vid behov, en kontrollsats med endast lösningsmedlet bör köras utöver serierna med testkemikaliekoncentrationer (se punkt 16).

Frekvens för analytiska bestämningar och mätningar

24. Innan exponeringsperioden inleds bör man se till att systemet för kemisk tillförsel fungerar i alla replikat (t.ex. genom att mäta testkoncentrationerna). Nödvändiga analytiska metoder bör fastställas, inklusive en lämplig kvantifieringsgräns (LOQ), och det är viktigt att inhämta tillräcklig kunskap om ämnets stabilitet i testsystemet. Under testets gång bestäms testkemikaliens koncentrationer med jämna mellanrum för att karakterisera exponeringen. Minst fem bestämningar behövs. I genomflödessystem bör analytiska mätningar av den undersökta kemikalien utföras i ett replikat per koncentration åtminstone en gång i veckan genom att systematiskt mäta olika replikat. Ytterligare analytiska bestämningar förbättrar ofta kvaliteten på testresultatet. Proverna kan behöva filtreras för att avlägsna eventuella partiklar (t.ex. med porstorlek 0,45 µm) eller centrifugeras för att se till att de analytiska bestämningarna görs på kemikalien i en äkta lösning. Filtren bör vara mättade före användning i syfte att minska adsorption av testkemikalien. När de uppmätta koncentrationerna inte håller sig inom 80–120 % av den nominella koncentrationen bör effektkoncentrationerna bestämmas och uttryckas i förhållande till koncentrationens aritmetiska medelvärde för genomflödestest (se tillägg 6 till testmetod C.20 för beräkning av det aritmetiska medelvärdet (8)), och uttryckas i förhållande till det geometriska medelvärdet av de uppmätta koncentrationerna för semistatiska tester (se kapitel 5 i OECD:s vägledningsdokument om akvatisk toxicitetstestning av svåra ämnen och blandningar (2)).
25. Under testets gång bör löst syre, pH och temperatur mätas i alla testkärn minst en gång i veckan. Salthalt och hårdhet, om relevant, bör mätas i början och slutet av testet. Temperaturen bör helst övervakas kontinuerligt i minst ett testkärn.

Observationer

26. **Stadiet för embryonal utveckling:** Det embryonala stadiet när exponeringen för testämnet inleds bör bekräftas så exakt som möjligt. Detta kan göras på ett representativt prov av ägg som har förvarats och rengjorts på lämpligt sätt.
27. **Kläckning och överlevnad:** observationer av kläckning och överlevnad bör göras minst en gång per dag. Alla antal bör registreras. Om svamp observeras på äggen i ett tidigt skede av embryoutvecklingen (t.ex. dag ett eller två av testet), bör dessa ägg räknas och tas bort. Döda embryon, yngel och ungfisk bör avlägsnas så snart de observeras, eftersom de snabbt kan förruttna och sönderdelas av de andra fiskarna. Yttersta försiktighet bör iaktas när döda individer avlägsnas så att man inte orsakar fysiska skador på närliggande ägg eller yngel. Tecken på dödlighet varierar beroende på art och levnadsstadium. Exempel:
- Befruktade ägg: särskilt i tidiga stadier en tydlig förlust av genomskinlighet och färgförändringar orsakade av koagulering eller utfällning av protein, vilket leder till ett vitt ogenomskinligt utseende.
 - Embryon, yngel och ungfiskar: orörlighet och/eller avsaknad av andningsrörelse och/eller avsaknad av hjärtslag och/eller avsaknad av reaktion på mekanisk retning.
28. **Onormalt utseende:** antalet yngel eller ungfisk som har onormal kroppsform bör registreras med intervall vars längd bestäms enligt testperiodens längd och karaktären hos de abnormiteter det gäller. Det bör noteras att onormala yngel och ungfiskar även förekommer av naturliga skäl, och kan för vissa arter uppgå till flera procent i kontrollen eller kontrollerna. Om missbildningar och relaterat onormalt beteende anses så svåra att organismen orsakar väsentligt lidande och den har nått en punkt där den inte kommer att återhämta sig kan organismen tas bort från testet. Sådana djur bör avlivas och anges som döda i den påföljande dataanalysen. Normal embryoutveckling har dokumenterats för de flesta arter som rekommenderas i denna metod (9) (10) (11) (12).
29. **Onormalt beteende:** abnormiteter som hyperventilation, okoordinerat simmande, atypisk passivitet och atypiskt utfodringsbeteende bör registreras med lämpliga intervall beroende på testperiodens längd (t.ex. en gång om dagen för varmvattensarter). Sådana verkningar kan vara svåra att kvantifiera men kan, när de observeras, vara till hjälp vid tolkningen av dödlighetsdata.

30. **Vikt:** i slutet av testet vägs alla överlevande fiskar minst per replikat (antal djur i replikatet samt djurens medelvikt rapporteras). Våtvikt (avtorkning) är att föredra, men även torrviktsdata kan rapporteras (13).
31. **Längd:** vid testets slut mäts individuella längder. Total längd rekommenderas, men om det förekommer röta på stjärtfenan eller frätning av fenorna kan standardlängd användas. Samma metod bör användas för all fisk i ett givet test. Individuell längd kan mätas med t.ex. skjutmått, digital kamera eller kalibrerad okulär mikrometer. Vanliga minimilängder anges i tillägg 2.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

32. Försöket och urvalet av det statistiska testet bör utformas för att ge tillräcklig effekt (80 % eller högre) så att det är möjligt att upptäcka förändringar av biologisk betydelse i endpoints när NOEC ska rapporteras. Rapporteringen av relevanta effektkoncentrationer och parametrar kan bero på regelverket. Om en effektkoncentration (EC_x) ska rapporteras bör utformningen av försöket och valet av regressionsmodell möjliggöra uppskattning av EC_x , så att i) det 95-procentiga konfidensintervall som rapporteras för EC_x inte innehåller noll och inte är alltför brett, ii) det 95-procentiga konfidensintervallet för det beräknade medelvärdet vid EC_x inte innehåller kontrollmedelvärdet, och iii) det inte finns betydande "lack-of-fit" (bristande anpassning) för regressionsmodellen jämfört med data. Båda tillvägagångssätten kräver identifiering av den procentuella förändring i varje endpoint som det är viktigt att upptäcka eller uppskatta. Försöket bör utformas för att möjliggöra denna identifiering. När ovannämnda villkor för att bestämma EC_x inte är uppfyllda bör NOEC-metoden användas. Samma procentuella förändringar är sannolikt inte tillämpliga på alla endpoints, och det är inte heller sannolikt att man kan utforma försök som uppfyller ovannämnda kriterier för alla endpoints. Därför är det viktigt att fokusera på de endpoints som är relevanta för varje försök för att kunna utforma försöket på lämpligt sätt. Statistiska flödesdiagram och vägledning för varje metod finns i tilläggen 5 och 6, med riktlinjer för databehandling och råd för att underlätta valet av lämpligaste statistiska test eller metod. Andra statistiska metoder kan användas under förutsättning att de är vetenskapligt motiverade.
33. Det är nödvändigt att analysera variationerna inom varje replikatgrupp med hjälp av variansanalys eller kontingenstabellprocedurer. Lämpliga statistiska analysmetoder bör användas baserat på denna analys. För multipla jämförelser mellan resultaten vid enskilda koncentrationer och resultaten för kontrollerna rekommenderas Jonckheere-Terpstras step-down-test eller Williams test för kontinuerlig respons och Cochran-Armitages step-down-test för dikotom respons som överensstämmer med en monoton koncentrationsrespons där bevis saknas för extrabinomial varians (14). När det finns bevis för extrabinomial varians rekommenderas Rao-Scott-modifieringen av Cochran-Armitage-testet (15) (16), eller Williams- eller Dunnetts-testet (efter en arcsin-kvadratrot-transformation) eller Jonckheere-Terpstra-testet för att reproducera proportionerna. Om uppgifterna inte överensstämmer med en monoton koncentrationsrespons kan Dunnetts-, Dunns- eller Mann-Whitney-metoderna vara användbara för kontinuerlig respons, och Fishers exakta test för dikotom respons (14) (17) (18). Statistiska metoder eller modeller bör användas med försiktighet så att man säkerställer att kraven för metoden eller modellen är uppfyllda (variationer mellan behållare ska t.ex. uppskattas och anges i det försök eller de tester och modeller som används). Uppgifterna ska utvärderas för normalitet. Information om hur rester från ANOVA bör hanteras ges i tillägg 5. I tillägg 6 diskuteras ytterligare överväganden i samband med regressionsmetoden. Förändringar för att uppfylla kraven för statistiska tester bör övervägas. Transformationer för att anpassa en regressionsmodell kräver dock stor omsorg. En förändring på 25 % i den otransformerade responsen motsvarar inte en förändring på 25 % i en transformerad respons. För alla analyser gäller att analysenheten inte är den enskilda fisken, utan testbehållaren. Försöksenheten och både hypotesprövningarna och regressionen bör därför avspegla detta (3) (14) (19) (20).

Testrapport

34. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

Monokomponentämne:

- fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,
- kemisk beteckning, såsom IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, SMILES- eller InCh-kod, strukturell formel, renhet, kemisk beteckning för orenheter i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt osv. (vid behov, inklusive halten organiskt kol).

Multikomponentämne, UVCB och blandningar:

- karakteriseras så långt som möjligt, t.ex. genom kemisk beteckning (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos komponenterna.

Testade arter:

- vetenskapligt namn, stam, härkomst och metod för insamling av befruktade ägg och efterföljande hantering.

Testbetingelser:

- använt testförfarande (t.ex. semistatiskt, genomflöde, fisktäthet),
- ljusperiod(er).
- testets upplägg (t.ex. antal testbehållare och replikat, antal ägg per replikat, testbehållarens material och storlek (höjd, bredd, volym), vattenvolym per testbehållare),
- metoden för beredning av stamlösningar och förnyelsefrekvensen (i förekommande fall bör även solubiliseringsmedlet och dess koncentration anges),
- doseringsmetod för testkemikalien (t.ex. pumpar, utspädningssystem),
- metodens återvinningseffektivitet och nominella testkoncentrationer, kvantifieringsgränsen, de uppmätta värdenas medelvärden och deras standardavvikelser i testkärnen samt den metod med vilken dessa erhöles och bevis för att mätningarna hänför sig till testkemikaliens koncentrationer i en äkta lösning,
- utspädningsvattnets egenskaper: pH, hårdhet, koncentrationen löst syre, restklornivåer (om de har uppmätts), totalt organiskt kol (om det har uppmätts), uppslammade partiklar (om det har uppmätts), testmediets salthalt (om den har uppmätts) och resultatet av alla övriga mätningar,
- vattenkvaliteten i testkärnen: pH, hårdhet, temperatur och koncentrationen löst syre,
- detaljerade uppgifter om utfodringen (t.ex. typ av foder, källa, hur mycket fiskarna har fått och hur ofta).

Resultaten rapporteras individuellt (eller per replikat) och som medelvärde och variationskoefficient, när så är lämpligt, för följande endpoints:

- bevis för att kontrollerna uppfyller normerna för total överlevnad för testdjur (tillägg 2),
- data om dödlighet i varje stadium (embryo-, yngel- och ungfiskstadiet) och kumulativ dödlighet,
- antalet dagar fram till kläckning, antal kläckta yngel per dag och tidpunkten för kläckningens slut,
- antal friska exemplar vid testets avslutning,
- data om längd (ange antingen standard eller totalt) och vikt för överlevande djur,
- förekomst, beskrivning av och antal morfologiska abnormiteter (i förekommande fall),
- förekomst, beskrivning av och antal beteendemässiga effekter (i förekommande fall),

- metod för den statistiska analysen (regressionsanalys eller variansanalys) samt databehandling (använt statistiskt test eller använd modell),
- nolleffektkoncentration (NOEC) för varje respons som har varit föremål för bedömning,
- lägsta koncentration med observerad effekt (vid $p = 0,05$) för varje bedömd respons (LOEC),
- EC_x för varje bedömd respons (i förekommande fall) samt konfidensintervall (t.ex. 90 % eller 95 %) och kurvan för den anpassade modell som använts för att beräkna EC_x , lutningen för koncentration-responskurvan, formeln för regressionsmodellen och uppskattade modellparametrar och deras standardfel.

Eventuella avvikelser från testmetoden.

Diskussion av resultaten, inbegripet eventuell inverkan på testresultatet av avvikelser från denna testmetod.

Tabell 1

Fiskarter som rekommenderas för testning

SÖTVATTEN	BRACK- och HAVSVATTEN
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Regnbåge	<i>Cyprinodon variegatus</i> Sheepshead minnow (art av tandkarp)
<i>Pimephales promelas</i> Knölskallelöja	<i>Menidia</i> sp. Silverlax
<i>Danio rerio</i> Sebrafisk	
<i>Oryzias latipes</i> Medaka (japansk risfisk)	

LITTERATUR

- (1) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment nr 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, nr 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. s. 26 ff.
- (4) Brauhn, J.L. och 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. och 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, m.fl. (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. m.fl. (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69–92.
- (8) Kapitel C.20 i denna bilaga, Reproduktionstest på *Daphnia magna*.

-
- (9) Hansen, D.J. och P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) for life-cycle toxicity tests, In *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation* (redigerad av F.L. Mayer och J.L. Hamelink), ASTM STP 634.
- (10) Kimmel, H. B. m.fl. (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203:253–310.
- (11) Gonzalez-Doncel, M. m.fl. (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. m.fl. (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 och 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 nr 54, OECD, Paris.
- (15) Rao, J. N. K. och A. J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics* 48, 577–585.
- (16) Rao, J. N. K. och 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. och S.R. Petrocelli (1985), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publication Corporation, New York.
- (20) McClave, J.T., J.H. Sullivan och J.G. Pearson (1980). *Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data*, *Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium*, ASTM, Philadelphia.
-

Tillägg 1

DEFINITIONER

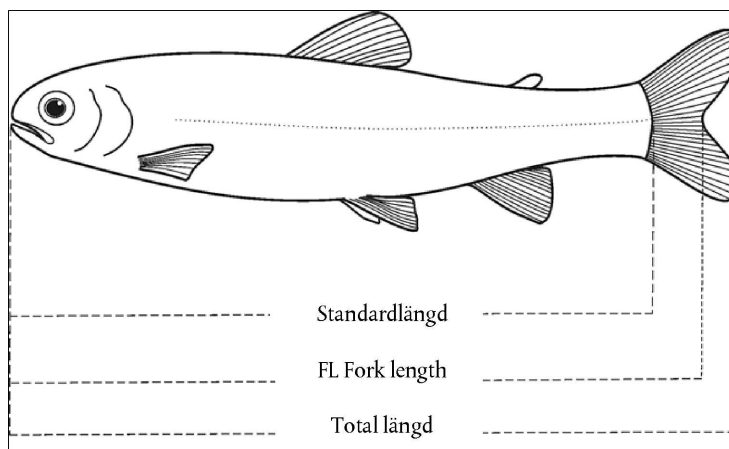
FL: längd från nospetsen till stjärtfenans delning, används för fiskarter där det är svårt att säga var ryggraden slutar (www.fishbase.org)

SL: standardlängd, längd från nospetsen till bakre delen av den sista ryggkotan eller bakre slutet av den mellersta delen av hypuralplattan. Enkelt uttryckt utesluter denna mätning stjärtfenans längd. (www.fishbase.org)

TL: total längd, längd från nospetsen till slutet av stjärtfenans längre flik, mäts vanligen med flikarna komprimerade längs mittlinjen. Detta är ett linjärt mått, som inte mäter kroppscurvan (www.fishbase.org)

Figur 1

Beskrivning av de olika längder som används



Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

EC_x: (koncentration som orsakar x % effekt): den koncentration som orsakar en x-procentig effekt på testorganismerna inom en given exponeringstid jämfört med ett kontrollprov. EC₅₀ är till exempel den koncentration som beräknas ha en effekt på en av testets endpoints i 50 % av en exponerad population under en fastställd exponeringstid.

Lägsta koncentration med observerad effekt (LOEC): den lägsta testade koncentration vid vilken man kan fastställa att testkemikalien har en statistiskt signifikant effekt (vid $p < 0,05$) jämfört med kontrollen. Alla testkoncentrationer ovanför LOEC bör ha skadliga verkningar som är lika stora som eller större än de verkningar som observeras vid LOEC. Om dessa två villkor inte är uppfyllda bör en fullständig förklaring ges till hur man har valt LOEC (och därmed NOEC). Vägledning ges i tilläggen 5 och 6.

Nolleffektkoncentration (NOEC): den testkoncentration omedelbart under LOEC som inom en fastställd exponeringsperiod inte framkallar några statistiskt signifikanta verkningar ($p < 0,05$) jämfört med kontrollen.

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

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

IUPAC: Internationella kemiunionen.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification

TESTBETINGELSER, TESTPERIOD OCH ÖVERLEVNADESKRITERIER FÖR REKOMMENDERADE ARTER

ARTER	TESTBETINGELSER			REKOMMENDERAD LÄNGD FÖR TESTPERIODEN	Normal minsta genomsnittliga totallängd för kontrollfisk i slutet av undersökningen (mm) ⁽¹⁾	ÖVERLEVNAD I KONTROLLER (minimum)	
	Temperatur (°C)	Salthalt (‰)	Fotoperiod (timmar)			Kläckningsframgång	Framgång efter kläckning
Sötvatten:							
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Regnbåge	10 ± 1,5 ⁽²⁾		12–16 ⁽³⁾	2 veckor efter det att kontrollerna börjar födosöka (eller 60 dagar efter kläckning)	40	75 %	75 %
<i>Pimephales promelas</i> Knölskallelöja	25 ± 1,5		16	32 dagar från testets början (eller 28 dagar efter kläckning)	18	70 %	75 %
<i>Danio rerio</i> Sebrafisk	26 ± 1,5		12–16 ⁽⁴⁾	30 dagar efter kläckning	11	70 %	75 %
<i>Oryzias latipes</i> Medaka (japansk risfisk)	25 ± 2		12–16 ⁽⁴⁾	30 dagar efter kläckning	17	80 %	80 %
Brack- och havsvatten:							
<i>Cyprinodon variegatus</i> Sheepshead minnow (art av tandkarp)	25 ± 1,5	15–35 ⁽⁵⁾	12–16 ⁽⁴⁾	32 dagar från testets början (eller 28 dagar efter kläckning)	17	75 %	80 %
<i>Menidia</i> sp. Silverlax	22–25	15–35 ⁽⁵⁾	13	28 dagar	20	80 %	60 %

Teckenförklaring:

- ⁽¹⁾ Minsta genomsnittliga totallängd är vanligen inte ett giltighetskriterium, men avvikelser under den angivna siffran bör undersökas noggrant när det gäller testets sensitivitet. Den minsta genomsnittliga totallängden härleds från ett urval av uppgifter som finns tillgängliga vid den aktuella tidpunkten.
- ⁽²⁾ Den särskilda stam av regnbåge som testas kan kräva andra temperaturer. Avelsbestånd måste hållas vid samma temperatur som ska användas för äggen. När ägg mottas från kommersiella uppfödare krävs en kort anpassningsperiod (t.ex. 1–2 timmar) för att testa temperaturen efter ankomst.
- ⁽³⁾ Mörker för yngel tills det gått en vecka efter kläckning, utom när de inspekteras. Därefter dämpad belysning under hela testet (12–16 timmars ljusperiod) ⁽⁴⁾.
- ⁽⁴⁾ Ljusregimen bör vara konstant för varje testningsförhållande.
- ⁽⁵⁾ Salthalten ska hållas inom ± 2 ‰ för varje test.

VÄGLEDNING OM UTFODRING OCH HANTERING AV FISKYNGEL OCH TESTDJUR FRÅN REKOMMENDERADE ARTER

ARTER	FODER (*)				ÖVERFÖRINGSTID- PUNKT EFTER KLÄCK- NING	TID TILL FÖRSTA UTFODRING
	Fiskyngel	Nyligen kläckta yngel	Ungfisk			
			Typ	Frekvens		
Sötvatten:						
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Regnbåge	Öringfoder	Inget ^(a)	Startfoder för öring, BSN	2–4 utfodringar per dag	14–16 dagar efter kläckning eller när de simmar upp (ej nöd- vändigt)	19 dagar efter kläckning eller när de simmar upp
<i>Pimephales promelas</i> Knölskallelöja	BSN, flingfoder, FBS	BSN	BSN48, flingfoder	2–3 gånger om dagen	När kläckningen är 90 %	2 dagar efter kläckning
<i>Danio rerio</i> Sebrafisk	BSN, flingfoder	Kommersiellt yngelfo- der, protozoer ^(b) , pro- tein ^(c)	BSN48, flingfoder	BSN en gång per dag Flingfoder två gånger per dag	När kläckningen är 90 %	2 dagar efter kläck- ningen
<i>Oryzias latipes</i> Medaka (japansk risfisk)	Flingfoder	BSN, flingfoder (eller protozoer eller hjul- djur)	BSN48, flingfoder (eller hjuldjur)	BSN en gång per dag, flingfoder två gånger per dag <u>eller</u> flingfoder och hjuldjur en gång per dag	Ej tillämpligt	6–7 dagar efter lek
Brack- och havsvatten:						
<i>Cyprinodon variegatus</i> Sheepshead minnow (art av tandkarp)	BSN, flingfoder, FBS	BSN	BSN48	2–3 utfodringar per dag	Ej tillämpligt	1 dag efter kläckning/ uppsimning
<i>Menidia sp.</i> Silverlax	BSN48, flingfoder	BSN	BSN48	2–3 utfodringar per dag	Ej tillämpligt	1 dag efter kläckning/ uppsimning

Teckenförklaring:

(*) Mat bör ges till mättnadstillstånd. Vid behov bör överbliven mat och avföring avlägsnas för att undvika ackumulering av avfall.

FBS frysta saltkräftor, vuxna *Artemia* sp.

BSN saltkräftor, nykläckta naupliuslarver

BSN48 saltkräftor, 48 timmar gamla naupliuslarver

^(a) yngel i gulesäcken behöver inget foder^(b) filtreras från blandad kultur^(c) granulat från jäsningsprocessen

Tillägg 4

NÅGRA KEMISKA EGENSKAPER FÖR GODTAGBART UTSPÄDNINGSVATTEN

Komponent	Koncentrationsgränsvärde
Partiklar	5 mg/l
Halt av organiskt kol	2 mg/l
Icke-joniserad ammoniak	1 µg/l
Resterande mängd klor	10 µg/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska fosforföreningar	< 50 ng/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska klorföreningar plus polyklorerade bifenyler	< 50 ng/l
Total mängd organiskt klor	< 25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arsenik	1 µg/l
Krom	1 µg/l
Kobolt	1 µg/l
Koppar	1 µg/l
Järn	1 µg/l
Bly	1 µg/l
Nickel	1 µg/l
Zink	1 µg/l
Kadmium	< 100 ng/l
Kviksilver	< 100 ng/l
Silver	< 100 ng/l

Tillägg 5

STATISTISK VÄGLEDNING FÖR BESTÄMNING AV NOEC

Allmänt

Analysenheten är replikatkärl. För kontinuerliga mätningar, såsom storlek, bör medel- eller medianvärdet för replikatet räknas ut och dessa replikatvärden utgör de data som ska analyseras. Styrkan hos det test som används bör påvisas, företrädesvis baserat på en lämplig historisk databas för varje laboratorium. Den storlekseffekt som kan upptäckas med 75–80 % styrka bör anges för varje endpoint med de statistiska test som ska användas.

De databaser som finns tillgängliga när testmetoden utvecklas avgör den styrka som är möjlig med de rekommenderade statistiska förfarandena. Enskilda laboratorier ska visa att de kan uppnå denna styrka genom att utföra egna styrkeanalyser eller genom att visa att variationskoefficienten (VC) för varje respons inte överstiger den 90:e percentilen för de variationskoefficienter som används för att utveckla testriktlinjen. Variationskoefficienterna anges i tabell 1. Om endast medel- eller medianvärden finns tillgängliga för replikatet kan variationskoefficienten inom replikatet ignoreras.

Tabell 1

Variationskoefficienter 90:e percentilen för utvalda sötvattensarter

Art	Respons	VC_mellan replikat	VC_inom replikat
Regnbåge	Längd	17,4	9,8
	Vikt	10,1	28
Knölskallelöja	Längd	16,9	13,5
	Vikt	11,7	38,7
Sebrafisk	Längd	43,7	11,7
	Vikt	11,9	32,8

För nästan alla statistiska tester som används för att utvärdera toxikologiska laboratorieundersökningar är det jämförelserna mellan behandlings- och kontrollgrupperna som är intressanta. Därför är det inte lämpligt att kräva ett signifikanstest enligt ANOVA F innan man använder Dunnetts eller Williams test eller kräva ett signifikanstest enligt Kruskal-Wallis innan man använder Jonckheere-Terpstra-, Mann-Whitney- eller Dunn-testet (Hochberg och Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson m.fl. 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

Dunnetts test har en inbyggd multiplicitetsjustering och dess falska positiva och negativa värden påverkas negativt om F-testet används som grindvakt. På samma sätt erhålls en negativ påverkan av Williams och Jonckheere-Terpstras tester av step-down-typ med användning av en signifikansnivå på 0,05 vid varje steg med bevarande av ett totalt falskt värde på 5 % samt det värdet och testets styrka om F-testet eller Kruskal-Wallis test används som grindvakt. Mann-Whitneys och Dunns tester måste justeras för multiplicitet, och här rekommenderas justeringen enligt Bonferroni-Holm.

En ingående diskussion av de flesta av rekommendationerna om hypotesprövning och verifiering av underliggande antaganden för dessa tester återfinns i OECD (2006), som även innehåller en omfattande litteraturförteckning.

Behandling av kontroller när lösningsmedel används

Om lösningsmedel används bör både en kontroll av utspädningsvattnet och lösningsmedlet ingå i förfarandet. De två kontrollerna bör jämföras för varje respons och kombineras för statistisk analys om ingen signifikant skillnad påvisas mellan kontrollerna. I annat fall bör lösningsmedelskontrollen användas för NOEC-bestämningen eller skattningen av EC_{50} . Då används ingen vattenkontroll. Se begränsning av giltighetskriterier (punkt 7).

För längd, vikt, andelen kläckta ägg, dödlighet hos yngel eller onormala yngel samt första och sista dagen för kläckning eller uppsimning bör T-testet eller Mann-Whitneys test användas för att jämföra kontrollen av utspädningsvatten och av lösningsmedel vid en signifikansnivå på 0,05. I detta fall ignoreras alla behandlingsgrupper. Resultaten av dessa tester bör rapporteras.

Storleksmätningar (längd och vikt)

Individuella fiskars längd- och viktvärden kan ha en normal eller log-normalfördelning. I båda fallen brukar replikatens medelvärden vara normalt fördelade enligt den centrala gränsvärdessatsen och bekräftas av data från över 100 ELS-studier av tre sötvattensarter. Om data eller historiska databaser tyder på en log-normalfördelning för individuella fiskars storleksvärden kan medelvärdet av replikatets logaritmer för de individuella värdena beräknas och analysdata kan då vara antiloggar för dessa medelvärden av replikatets logaritmer.

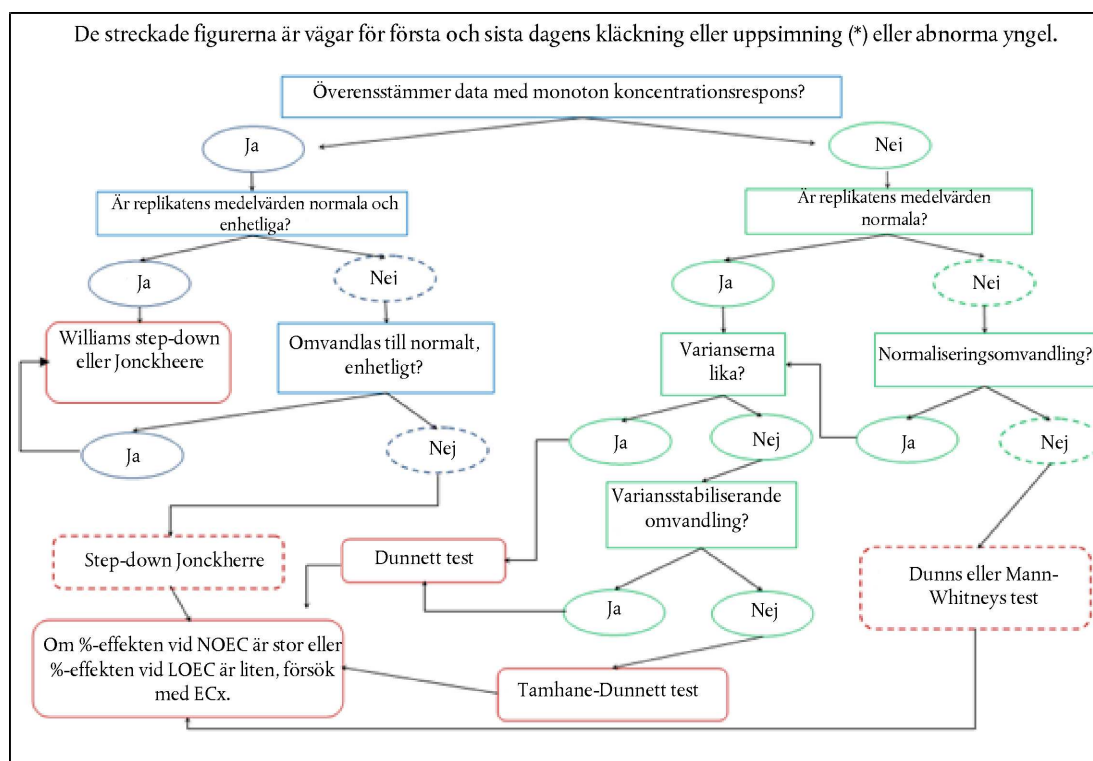
Data bör utvärderas för överensstämmelse med en normalfördelning och variansens homogenitet. Residualer från ANOVA-modellen med koncentration som enda förklarande klassvariabel bör användas för detta ändamål. Visuellt bestämning med hjälp av punktdiagram och histogram eller stam-blad-diagram kan användas. Alternativt kan ett formellt test som Shapiro-Wilk eller Anderson-Darling användas. Överensstämmelse med variansens homogenitet kan bedömas med hjälp av en visuell undersökning av samma punktdiagram eller formellt genom Levenes test. Endast parametriska tester (Williams, Dunnett) behöver utvärderas för normalitet eller variansens homogenitet.

Eventuella avvikande värden och deras inverkan på analysen bör uppmärksammas. Tukeys test för avvikande värden samt visuell inspektion av samma residualdiagram som beskrivs ovan kan användas. Det är viktigt att tänka på att observationerna rör hela replikaten och avvikande värden bör därför utelämnas från analysen först efter noggrant övervägande.

De statistiska tester som använder inslag av experimentell design och biologiska förväntningar är trendtester av step-down-typ, som Williams och Jonckheere-Terpstra. Dessa tester förutsätter en monoton koncentrationsrespons och data bör bedömas för överensstämmelse med detta antagande. Detta kan ske visuellt genom ett punktdiagram för replikatets medelvärden mot testkoncentrationen. Det kan vara till hjälp att täcka punktdiagrammet med ett punktvis linjärt diagram som kopplar koncentrationens medelvärden viktade med samma provstorlek för replikatet. Om det punktvisa linjära diagrammet visar en kraftig avvikelse från monotonicitet är det eventuellt nödvändigt att använda icke-trendtester. Alternativt kan formella tester användas. Ett enkelt formellt test är att beräkna linjära och kvadratiska kontraster i koncentrationens medelvärden. Om den kvadratiska kontrasten är betydande och den linjära kontrasten är icke-betydande tyder detta på ett eventuellt problem med monotonicitet, som bör utvärderas ytterligare med hjälp av diagrammen. Om normaliteten eller variansens homogenitet är problematiska kan dessa kontraster konstrueras från transformerade rangordnade data. Alternativa förfaranden såsom Bartholomews test för monotonicitet kan användas, men då måste komplexitet läggas till.

Figur 2

NOEC-flödesdiagram för storleksmätningar (längd och vikt)



(*) Dessa responser tillfredsställer aldrig antaganden från parametriska analyser eller modeller.

Om data inte överensstämmer med kraven för dessa tester bestäms NOEC genom ett Williams- eller Jonckheere-Terpstra-test av step-down-typ. Information om dessa förfaranden ges i OECD (2006). För data som inte överensstämmer med kraven för ett trendtest av step-down-typ kan Dunnetts eller Tamhane-Dunnetts (T3) test användas, eftersom båda testerna har inbyggda justeringar för multiplicitet. Dessa tester förutsätter normalitet och, när det gäller Dunnett, variansens homogenitet. Om dessa villkor inte är uppfyllda kan Dunns icke-parametriska test användas. OECD (2006) innehåller information om alla dessa tester. I figur 2 ges en översikt av hur man väljer test.

Kläckta ägg och överlevande yngel

Data är andelen kläckta ägg eller yngel som överlever i de individuella replikaten. Dessa andelar bör bedömas för extrabinomial varians, som är vanligt men inte generellt för sådana mätningar. Flödesschemat i figur 3 ger vägledning om hur man väljer test, se texten för detaljerade beskrivningar.

Två tester används ofta, nämligen Tarones C(α)-test (Tarone, 1979) och chi-två-test, varje test tillämpas separat för varje testkoncentration. Om extrabinomial varians påträffas i en testkoncentration bör metoder som omfattar detta användas.

Formel 1:

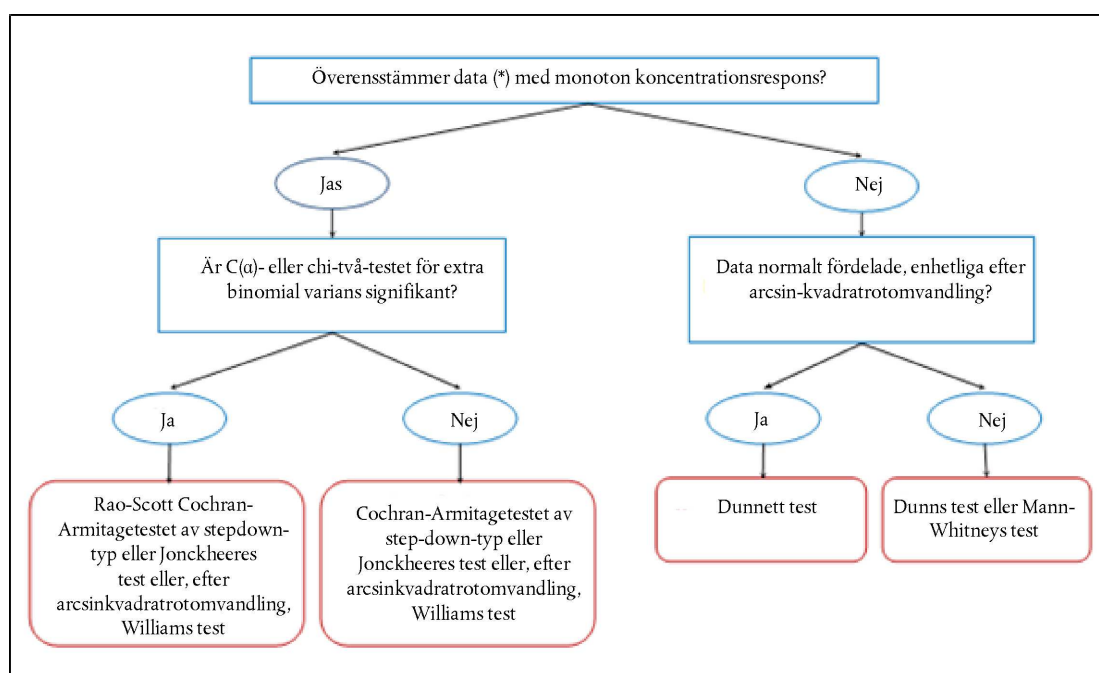
Tarones C (α)-test (Tarone 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^m \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1 - \hat{p})} - \sum_{j=1}^m n_j}{\left\{ 2 \sum_{j=1}^m n_j (n_j - 1) \right\}^{1/2}}$$

där $\hat{p}$ är den genomsnittliga andelen för en given koncentration, m är antalet replikatkarl, n_j är antalet ämnen i replikat j , och x_j är antalet djur i replikatet som svarar, t.ex. ej kläckta djur eller döda djur. Detta test ska tillämpas separat på varje koncentration. Testet kan betraktas som ett justerat chi-två-test, men begränsade kraftsimulationer som har utförts av Tarone har visat att det är mer kraftfullt än ett chi-två-test.

Figur 3

NOEC-flödesschema för kläckta ägg och dödlighet hos yngel



(*) Uppgifterna motsvarar replikatets andel.

Om det inte finns några tydliga tecken på extrabinomial varians kan ett Cochran-Armitage-test av step-down-typ användas. Detta test ignorerar replikaten, så när det finns sådana belägg beaktar Rao-Scott-justeringen av Cochran-Armitages test (RSCA) replikaten, replikatens storlekar och den extrabinomiala variansen, och rekommenderas därför. Alternativa tester är Williams- och Jonckheere-Terpstra-tester av step-down-typ och Dunnetts test, enligt beskrivningen av storleksmätningar. Dessa tester är tillämpliga vare sig extrabinomial varians förekommer eller ej, men har något mindre kraft (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao och Scott 1992, 1999, Fung m.fl. (1994, 1996).

Första eller sista dagen för kläckning eller uppsimning

Responsen är ett heltal, som anger den testdag då den angivna observationen iaktas för ett visst replikatkarl. Urvalet av värden är i regel mycket begränsat och det förekommer ofta en hög andel bundna värden, t.ex. att samma första kläckningsdag observeras i alla kontrollreplikater och kanske i en eller två låga testkoncentrationer. Parametriska tester såsom Williams och Dunnett är inte lämpliga för sådana data. Om det inte finns bevis på allvarlig icke-monotonicitet är ett Jonckheere-Terpstra-test av step-down-typ mycket kraftfullt för att upptäcka effekter av testkemikalien. Annars kan Dunns test användas.

Abnormiteter hos yngel

Responserna är antalet yngel som befunnits vara onormala på något sätt. Denna respons har ofta låg incidens och kan uppvisa samma problem som första kläckningsdatumet. Oregelbunden koncentrationsrespons kan också förekomma. Om data åtminstone grovt liknar en monoton koncentrationsform är ett Jonckheere-Terpstra-test av step-down typ kraftfullt för att upptäcka effekter. Annars kan Dunns test användas.

LITTERATURHÄNVISNINGAR

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. och 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. nr 54. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.

Rao J.N.K. och Scott A.J. (1992) – A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics* 48, 577–585.

Rao J.N.K. och 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. och 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.

Tillägg 6

STATISTISK VÄGLEDNING FÖR REGRESSIONUPPSKATTNINGAR

Allmänt

De observationer som används för att anpassa modellen är replikatets medelvärden (längd och vikt) eller replikatets proportioner (kläckta ägg och dödlighet hos yngel) (OECD 2006).

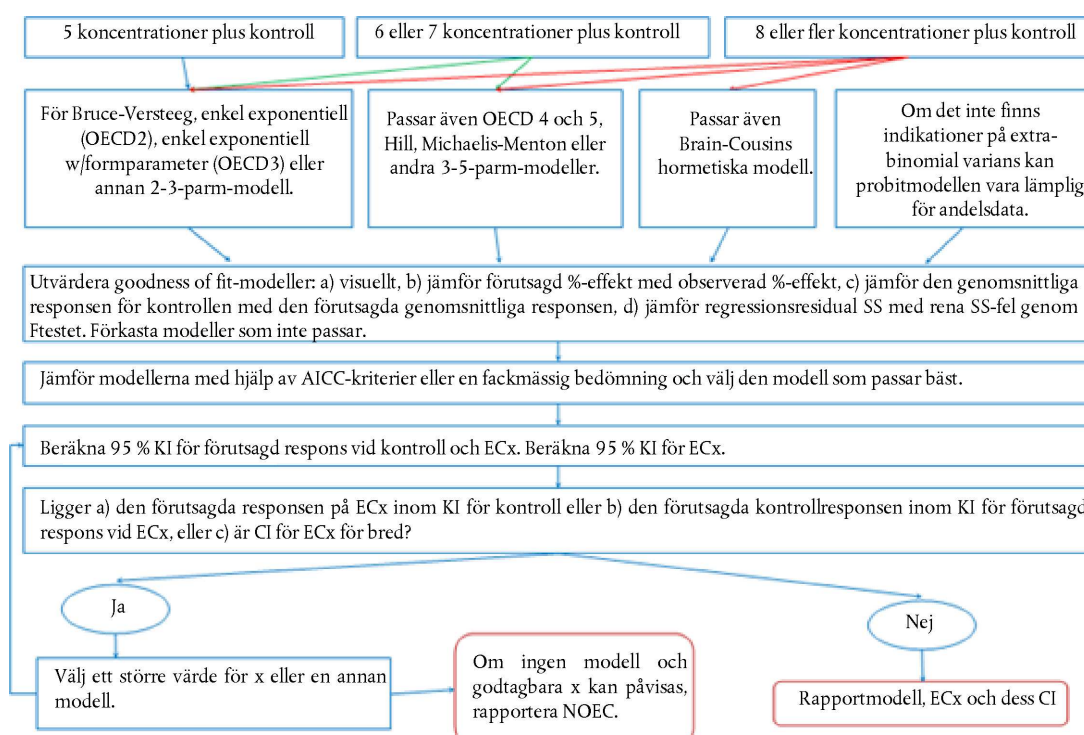
Viktad regression med användning av replikatets urvalsstorlek som vikt rekommenderas allmänt. Andra viktningssystem är dock möjliga, såsom viktning genom förutsagd genomsnittlig respons eller en kombination av detta och replikatets urvalsstorlek. Viktning genom ömsesidig urvalsvarians inom koncentrationen rekommenderas inte (Bunke m.fl. 1999, Seber och Wild, 2003, Motulsky och Christopoulos 2004, Huet m.fl. 2003).

Oberoende observationer bör bevaras vid eventuell transformation av responser före analys, och EC_x och dess konfidensgränser bör uttryckas i de ursprungliga måtenheterna, inte i transformerade enheter. En förändring på 20 % i logaritmen för längd motsvarar t.ex. inte en förändring på 20 % i längd (Lyles m.fl. 2008, Draper och Smith 1999).

Flödesdiagrammet i figur 4 ger en översikt av EC_x -uppskattningar. Detaljerna beskrivs i texten nedan.

Figur 4

Flödesschema för EC_x -uppskattning av replikatets genomsnittliga längd, vikt eller andelen kläckta ägg eller dödlighet hos yngel, se texten för mer information



Överväganden rörande antalet kläckta ägg och dödlighet hos yngel

För kläckta ägg och dödlighet hos yngel är det i regel bäst att anpassa en minskande modell om man inte anpassar en probitmodell såsom beskrivs nedan. Det innebär att man bör modellera andelen ägg som inte kläcks eller andelen döda yngel. Anledningen till detta är att EC_x avser en koncentration vid vilken det finns en förändring som motsvarar x % av kontrollens responsmedelvärde. Om 5 % av kontrolläggen inte kläcks och man modellerar antalet misslyckade kläckningar, avser EC₂₀ en koncentration vid vilken det sker en förändring som motsvarar 20 % ej kläckta ägg och 5 % kläckta ägg i kontrollen, vilket i sin tur motsvarar en förändring på $0,2 \times 0,05 = 0,01$ eller 1 procentenhet mot 6 % ej kläckta ägg. En sådan liten förändring kan inte beräknas på något meningsfullt sätt från tillgängliga data och är inte biologiskt viktig. Om man däremot modellerar andelen kläckta ägg skulle kontrollandelen i detta exempel motsvara 95 % och en minskning på 20 % av kontrollmedelvärdet skulle motsvara en förändring på $0,95 \times 0,2 = 0,19$, dvs. 95 % kläckta ägg till 77 % (= 95-18) kläckta ägg. Denna effektkoncentration kan uppskattas och är förmodligen av större intresse. Detta problem förekommer inte i storleksmätningar, men negativa effekter på storleken innebär i regel minskad storlek.

Modeller för storlek (längd eller vikt) och kläckta ägg eller överlevande yngel.

Med undantag för Brain-Cousins hormetiska modell beskrivs och rekommenderas alla dessa modeller i OECD (2006). Den så kallade OECD 2-5 diskuteras också i samband med ekotoxicitetsförsök i Slob (2002). Det finns naturligtvis många andra modeller som kan vara användbara. Bunke, m.fl. (1999) anger ett antal modeller som inte ingår här och det finns många hänvisningar till andra modeller. De metoder som anges nedan anses vara särskilt lämpliga för ekotoxicitetsförsök och är allmänt vedertagna.

Metod med fem testkoncentrationer plus kontroll.

- Bruce-Versteeg.
- Enkel exponentiell metod (OECD 2).
- Exponentiell metod med formparameter (OECD 3).
- Enkel exponentiell metod med nedre gräns (OECD 4).

Metod med sex eller fler testkoncentrationer plus kontroll.

- Exponentiell metod med formparameter och nedre gräns (OECD 5).
- Michaelis-Menton.
- Hill.

Om det finns synliga tecken på hormesis (osannolikt vad gäller kläckningsframgång och yngelöverlevnad, men förekommer ibland i storleksobservationer).

- Brain-Cousins Hormetic, Brain and Cousens (1989).

Alternativa modeller för misslyckade kläckningar och dödlighet hos yngel

- Ökande modeller för dessa responser kan anpassas med hjälp av probitmodeller (eller logistiska modeller) om det inte finns några belägg för extrabinomial varians och kontrollincidensen uppskattas i modellenanpassningen. Denna metod är dock inte att föredra eftersom den behandlar individen, inte replikaten, som analysenheter (Morgan 1992, O'Hara Hines och Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

Anpassningsgraden ("goodness of fit") för en enskild modell

- Gör en visuell jämförelse av observerade och förutsagda procentuella minskningar för varje testkoncentration (Motulsky och Christopoulos 2004, Draper och Smith 1999).

- Jämför regressionens medelkvadratsumma och den rena medelkvadratsumman genom användning av F-test (Draper och Smith 1999).
- Kontrollera att varje term i modellen avviker nämnvärt från 0 (fastställ om alla modelltermer är viktiga) (Motulsky och Christopoulos 2004).
- Residualdiagram från regressionen mot testkoncentrationen, möjligen enligt en log(konc.)skala. Diagrammet bör inte ha något mönster, utan punkterna bör vara slumpmässigt utspridda längs en horisontell linje vid nollhöjd.
- Uppgifterna bör utvärderas för normalitet och variansens homogenitet på samma sätt som anges i tillägg 5.
- Dessutom bör residualernas normalitet i regressionsmodellen bedömas med hjälp av samma metoder som anges i tillägg 5 för residualer från ANOVA.

Jämför modellerna.

- Använd Akiakes AICC-kriterier. Mindre AICC värden anger bättre anpassningar. Om $AICc(B) - AICc(A) \geq 10$ är modell A nästan säkert bättre än modell B (Motulsky och Christopoulos (2004).
- Jämför de två modellerna visuellt genom att titta på hur väl de uppfyller det enskilda modellkriteriet ovan.
- Sparsamhetsprincipen rekommenderas, vilket innebär att den enklaste modellen som passar uppgifterna rimligt väl används (Ratkowsky 1993, m.fl. Lyles 2008).

EC_x-skattningens kvalitet

Konfidensintervallet (KI) för EC_x bör inte vara för brett. Det krävs en statistisk bedömning för att avgöra hur stort konfidensintervallet får vara för att EC_x fortfarande ska vara användbart. Simuleringar för regressionsmodeller som är anpassade till antal kläckta ägg och storleksdata visar att ett konfidensintervall på cirka 75 % för EC_x (X = 10, 20 eller 30) inte sträcker sig över fler än två testkoncentrationer. Detta ger allmän vägledning om vad som är acceptabelt och praktiska råd om vad som är möjligt. Ett flertal författare hävdar att det är nödvändigt att rapportera konfidensintervall för alla modellparametrar och att breda konfidensintervall för modellparametrar tyder på att modellen är oacceptabel (Ott och Longnecker 2008, Alvord och Rossio 1993, Motulsky och Christopoulos 2004, Lyles m.fl. 2008, Seber och Wild 2003, Bunke m.fl. 1999, Environment Canada 2005).

KI för EC_x (eller någon annan modellparameter) får inte innehålla noll (Motulsky och Christopoulos 2004). Detta är motsvarigheten i regressionsmodeller till den minsta signifikanta skillnad som ofta citeras i hypotestestmetoder (t.ex. Wang m.fl. 2000). Det motsvarar också konfidensintervallet för de genomsnittliga LOEC-responser som inte innehåller kontrollmedelvärde. Man bör fråga sig om parameterskattningarna är vetenskapligt trovärdiga. Om konfidensintervallet för y₀ är ± 20 % är t.ex. ingen EC₁₀-skattning rimlig. Om modellen förutsäger en effekt på 20 % vid koncentration C och den maximala observerade effekten vid C och lägre koncentrationer är 10 %, är EC₂₀ inte rimlig (Motulsky och Christopoulos 2004, Wang m.fl. 2000, Environment Canada 2005).

EC_x bör inte kräva extrapolering utanför positiva koncentrationer (Draper och Smith 1999, OECD 2006). En allmän vägledning kan t.ex. vara att EC_x inte är mer än omkring 25 % lägre än den lägsta testade koncentrationen eller över den högsta testade koncentrationen.

LITTERATURHÄNVISNINGAR

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993), Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, *Journal of Immunological Methods* 157, 155–163.

Brain, P. och 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. och Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197–240.

Collett, D. (2002), *Modelling Binary Data*, andra upplagan, Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003), *Modelling Survival Data in Medical Research*, andra upplagan, Chapman and Hall, London.

Draper, N. R. och Smith, H. (1999), *Applied Regression Analysis*, tredje upplagan. 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, och C.R. Cooper (2008), Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. 29 november 2008, 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. och J. F. Lawless (1993), Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time, *Biometrics* Vol. 49, s. 107–121

OECD (2006), *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application*. Series Testing and Assessment, nr 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis*, sjätte upplagan, 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, och 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, s. 113–117, 2000.

C.48 Korttidstest av reproduktion hos fisk

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 229 (2012). Behovet av att utveckla och validera ett test på fisk som kan påvisa endokrint aktiva kemikalier härrör från farhågor att koncentrationen av kemikalier i miljön kan orsaka negativa effekter både hos människor och vilda djur på grund av samspelet mellan dessa kemikalier och det endokrina systemet. OECD inledde 1998 en högprioriterad verksamhet för att se över befintliga riktlinjer och utveckla nya riktlinjer för undersökning och testning av potentiellt endokrinstörande ämnen. Ett inslag i verksamheten var att utveckla en testmetod för undersökning av kemikalier som är verksamma på det endokrina systemet hos fiskarter. Det kortvariga reproduktionstestet på fisk genomgick ett omfattande valideringsprogram bestående av interlaborativa studier med utvalda kemikalier för att demonstrera testets relevans och tillförlitlighet för påvisning av kemikalier som påverkar reproduktionen hos fisk genom flera olika mekanismer, inklusive endokrina modaliteter (1, 2, 3, 4, 5). Alla endpoints i OECD:s testriktlinje har validerats för knölskallelöja, och en underordnad uppsättning endpoints har validerats för medaka (japansk risfisk) (dvs. vitellogenin och sekundära könskaraktärer) samt för sebrafisk (dvs vitellogenin). Valideringsarbetet har granskats av en expertpanel utsedd av de nationella samordnarna för OECD:s testmetodprogram (Test Guideline Programme) (6) och dels av en oberoende expertpanel på uppdrag av Förena staternas Environmental Protection Agency (29). Testet är inte utformat för att upptäcka särskilda hormonstörande mekanismer eftersom försöksdjuren har en intakt hypotalamus-hypofys-gonad-axel (HPG-axel), som kan reagera på kemikalier som påverkar HPG-axeln på olika nivåer.
2. Denna metod beskriver ett screeningtest in vivo där könsmogna lekande hanar och honor hålls tillsammans och exponeras för en kemikalie under en begränsad del av deras livscykel (21 dagar). Vid slutet av den 21 dagar långa exponeringstiden mäts en eller två biomarkörer som endpoints hos hanar och honor som indikatorer på testkemikalins endokrina aktivitet. Dessa endpoints är vitellogenin och sekundära könskaraktärer. Vitellogenin mäts hos knölskallelöja, medaka och sebrafisk, medan de sekundära könskaraktärerna mäts hos knölskallelöja och medaka. Dessutom övervakas kvantitativ fruktsamhet (fekunditet) dagligen under hela testet. Könskörtlar bevaras också och histopatologi kan utvärderas för att bedöma försöksdjurens reproduktiva lämplighet och komplettera den sammanvägda bedömningen av andra endpoints.
3. Denna bioanalys tjänar som en reproduktiv in vivo-screeninganalys och dess tillämpning bör ses mot bakgrund av OECD:s konceptuella ramverk för testning och bedömning av endokrinstörande kemikalier (30). I denna begreppsram föreslås det kortvariga reproduktionstestet på fisk på nivå 3 som en in vivo-analys som ger data om valda endokrina mekanismer eller vägar.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

4. Vitellogenin (VTG) produceras vanligen i levern hos honor av äggläggande ryggradsdjur som respons på cirkulerande endogen östrogen. Det är en prekursor till ägguleproteiner, och när det väl har producerats i levern förs det med blodet till äggstockarna, där det tas upp och modifieras av ägg som är under utveckling. Vitellogenin är nästan inte påvisbart i plasman hos icke könsmogna hon- och hanfiskar eftersom de saknar tillräckliga halter av cirkulerande östrogen. Levern kan dock bilda och utsöndra vitellogenin som respons på exogen östrogenstimulans.
5. Mätningen av vitellogenin tjänar till att påvisa kemikalier med olika östrogena verkningsmekanismer. Man kan påvisa ämnen med östrogena kemikalier genom mätning av vitellogenininduktionen hos hanfiskar, och detta har dokumenterats många gånger i den fackgranskade vetenskapliga litteraturen (t.ex. (7)). Vitellogenininduktion har också påvisats efter exponering för aromatiserbara androgener (8, 9). En minskning av nivåerna av cirkulerande östrogen hos honor, till exempel genom hämning av aromatasen som omvandlar det endogena androgenet till det naturliga östrogenet 17-beta-östradiol, orsakar en minskning av VTG-koncentrationen, som används för att påvisa kemikalier med aromatashämmande egenskaper (10, 11). Den biologiska relevansen av den vitellogeninrespons som följer östrogen hämning och aromatashämning har fastställts och har dokumenterats i stora drag. Det är dock möjligt att produktionen av VTG hos honor även kan påverkas av allmän toxicitet och icke-endokrina toxiska verkningsmekanismer, t.ex. hepatotoxicitet.

6. Flera mätmetoder har framgångsrikt utvecklats och standardiserats för rutinmässig användning. Detta gäller artspecifika testmetoder för ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) som använder immunokemiska tekniker för kvantifiering av det VTG som producerats i små blod- eller leverprover som insamlats från enskilda fiskar (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Prov tas på blod från knölskallelöja, blod eller huvud/stjärthomogenat från sebrafisk och lever från medaka för mätning av VTG. Hos medaka finns det en god korrelation mellan VTG mätt i blod och i leverprover (19). Tillägg 6 innehåller de rekommenderade förfarandena för provtagning för analys av VTG. Utrustning för mätning av VTG är lätt att få tag på. Denna utrustning bör bygga på en validerad artspecifik ELISA-metod.
7. De sekundära könskaraktärerna hos hanarna av vissa fiskarter är externt synliga, kvantifierbara och mottagliga för cirkulerande nivåer av endogena androgener. Detta är fallet för knölskallelöja och medaka, men inte för sebrafisk, som inte har några kvantifierbara sekundära könskaraktärer. Honor behåller förmågan att utveckla sekundära hanliga könskaraktärer om de exponeras för androgena kemikalier i vattnet. Flera studier finns tillgängliga i den vetenskapliga litteraturen som dokumenterar denna typ av respons hos knölskallelöja (20) och medaka (21). En minskning av de sekundära könskaraktärerna hos hanar bör tolkas med försiktighet på grund av dålig statistisk giltighet, och bör i stället bygga på en expertbedömning och på vikten av de sammanlagda bevisen. Det finns begränsningar för användningen av sebrafisk i detta test, eftersom dessa fiskar inte har några kvantifierbara sekundära könskaraktärer som är mottagliga för androgena kemikalier.
8. Hos knölskallelöja är den viktigaste indikatorn på exogen exponering för androgener antalet parningstuberkler på honornas nosar. Hos medaka utgör antalet papillära utväxter det huvudsakliga kännetecknet hos honor för exogen exponering för androgena kemikalier. I tilläggen 5A och 5B anges rekommenderade förfaranden som man bör följa när man utvärderar könskaraktärerna hos knölskallelöja och medaka.
9. Det 21 dagar långa fisktestet omfattar utvärdering av kvantitativ äggproduktion och bevarande av könskörtlar för valfri histopatologisk undersökning. Vissa tillsynsmyndigheter kan kräva denna ytterligare endpoint för en mer komplett utvärdering av testdjurens reproduktiva lämplighet, eller i fall där vitellogenin och sekundära könskaraktärer inte reagerat för kemisk exponering. Vissa endpoints kan vara mycket diagnostiska (t.ex. VTG-induktion hos hanar och knölbildning hos honor), men inte alla endpoints (t.ex. fruktsamhet och könskörtlarnas histopatologi) i testet är avsedda att entydigt identifiera specifika cellulära verkningsmekanismer. Det är snarare uppsättningen endpoints i stort som gör det möjligt att dra slutsatser om eventuella endokrina störningar, och därmed ge vägledning för vidare testning. Fruktsamhet är inte är endokrinspecifikt, men är bevisat känsligt för kända endokrinaktiva kemikalier (5) och är därför en viktig endpoint att inkludera. Om fruktsamhet och andra endpoints inte påverkas kan man nämligen vara mer säkra på att en sammansättning sannolikt inte är endokrinaktiv. Om fruktsamheten påverkas kommer denna endpoint emellertid att bidra starkt till interferenser i vikten av de sammanlagda bevisen. Närmare vägledning om tolkning av data och acceptans av testresultat ges i testmetoden.
10. Definitioner som används i denna testmetod finns i tillägg 1.

TESTPRINCIP

11. Med denna metod exponeras han- och honfiskar som är i ett reproduktivt stadium tillsammans i testkärlen. Deras status som vuxna djur i reproduktivt stadium gör att könen är tydligt särskiljbara och att de är mottagliga för exogena kemikalier, och därmed kan man göra en könsrelaterad analys av varje endpoint. Vid slutet av testet bekräftas könet med hjälp av makroskopisk undersökning av könskörtlarna efter att buken öppnats ventralt med sax. En översikt över de relevanta betingelserna för ett biologiskt test återfinns i tillägg 2. Testet inleds normalt med fisk som tagits från en population som befinner sig i lekstadium. Äldre djur bör inte

användas. Vägledning om fiskarnas ålder och reproduktiva status finns i avsnittet om urval av fisk. Testet genomförs med tre kemiska exponeringskoncentrationer och en vattenkontroll, och vid behov en lösningsmedelskontroll. Två kärl eller replikat per behandling används för sebrafisk (varje kärl innehåller fem hanar och fem honor), medan fyra kärl eller replikat per behandling används för knölskallelöja (varje kärl innehåller två hanar och fyra honor). Detta är för att tillgodose knölskallelöjhanens territoriella beteende samtidigt som testets giltighet upprätthålls. Fyra kärl eller replikat per behandling används för medaka (varje kärl innehåller 3 hanar och 3 honor). Exponeringens varaktighet är 21 dagar, och provtagningen på fiskarna sker på dag 21 av exponeringen. Kvantitativ fruktsamhet övervakas dagligen.

12. Vid provtagningen på dag 21 avlivs alla djuren på ett humant sätt. De sekundära könskaraktärerna mäts hos knölskallelöja och medaka (se tillägg 5A och 5B), blodprov tas för bestämning av VTG i sebrafisk och knölskallelöja eller huvud/stjärt samlas in för bestämning av VTG i sebrafisk (tillägg 6), och levern samlas in för VTG-analys av medaka (tillägg 6). Könskörtlarna fixeras antingen hela eller dissekeras för eventuell histopatologisk bedömning (22).

KRITERIER FÖR GODKÄNNANDE AV TESTET

13. För att testresultaten ska kunna godtas måste följande villkor uppfyllas:

- Dödligheten i vatten- eller lösningsmedelskontrollen bör inte överstiga 10 % i slutet av exponeringsperioden.
- Koncentrationen löst syre bör vara minst 60 % av luftmättnadsvärdet (ASV) under hela exponeringsperioden.
- Vattentemperaturen bör inte vid någon tidpunkt under exponeringsperioden variera med mer än $\pm 1,5$ °C mellan olika testkärl, och får variera med högst 2 °C från de temperaturgränser som specificerats för den art som används i testet (se tillägg 2).
- Bevis bör finnas tillgängliga som visar att koncentrationen av testkemikalien i lösningen på ett tillfredsställande sätt har hållits inom ± 20 % av de genomsnittliga uppmätta värdena.
- Bevis för att fisken aktivt leker i alla replikat innan den kemiska exponeringen inleds och i kontrollreplikaten under testet.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Utrustning

14. Normal laboratorieutrustning, och särskilt följande:

- a. syrgas- och pH-mätare,
- b. utrustning för bestämning av vattnets hårdhet och alkalinitet,
- c. lämplig utrustning för temperaturreglering, helst med kontinuerlig övervakning,
- d. akvarier tillverkade av kemiskt inert material och tillräckligt stora för den rekommenderade fisk- och antalstätheten (se tillägg 2),
- e. leksubstrat för knölskallelöja och sebrafisk (tillägg 4 innehåller de uppgifter som behövs),
- f. lämplig precisionsvåg (t.ex. noggrannhet $\pm 0,5$ mg).

Vatten

15. Allt vatten i vilket testarten uppvisar lämplig överlevnad och tillväxt kan användas som testvatten. Vattnet ska hålla jämn kvalitet under hela testperioden. Vattnets pH bör ligga inom intervallet 6,5–8,5 men får dock under ett givet test variera med högst $\pm 0,5$ pH-enheter. För att säkerställa att utspädningsvattnet inte påverkar testresultaten på oönskat sätt (t.ex. genom komplexbildning med testkemikalien) bör vattenprover tas regelbundet för analys. Mätningar av tungmetaller (t.ex. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd och Ni), viktiga anjoner och katjoner (t.ex. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- och SO_4^{2-}), bekämpningsmedel (t.ex. total mängd organiska fosforföreningar eller total mängd organiska klorföreningar), halten organiskt kol och uppslammade partiklar bör göras t.ex. var tredje månad i fall där man vet att utspädningsvattnet håller en relativt jämn kvalitet. Om vattenkvaliteten har visat sig vara jämn under minst ett år kan dessa kontroller göras med längre intervaller (t.ex. var sjätte månad). Några kemiska egenskaper för godtagbart utspädningsvatten anges i tillägg 3.

Testlösningar

16. Testlösningar med de valda koncentrationerna bereds genom utspädning av en stamlösning. Stamlösningen bör helst beredas genom att man helt enkelt blandar eller skakar testkemikalien i utspädningsvattnet på mekanisk väg (t.ex. omrörning eller ultraljud). Mättnadskolonner (löslighetskolonner) kan användas för att få en stamlösning med lämplig koncentration. Användning av lösningsmedel som bärämne rekommenderas inte. Om ett lösningsmedel måste användas kan man dock inrätta en lösningsmedelskontroll som testas parallellt med samma lösningsmedelskoncentration som i de kemiska behandlingarna. För kemikalier som är svåra att testa kan lösningsmedel tekniskt sett vara den bästa lösningen. OECD:s vägledningsdokument om akvatisk toxicitetstestning av svåra ämnen och blandningar bör konsulteras i sådana fall (23). Valet av lösningsmedel avgörs av testkemikaliens eller blandningens kemiska egenskaper. OECD:s vägledningsdokument rekommenderar högst 100 µl/l, en rekommendation som bör iakttas. En färsk undersökning (24) visade dock på ytterligare problem vid användning av lösningsmedel när man testar för endokrin aktivitet. Det rekommenderas därför att koncentrationen av ett eventuellt lösningsmedel begränsas till ett minimum om det är tekniskt genomförbart (beroende på testkemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper).
17. Ett genomflödestestsystem ska användas. Ett sådant system portionerar och späder kontinuerligt ut en stamlösning av testkemikalien (t.ex. med mätpump, proportionalitetslösningssystem och mättnadskärssystem) för att tillföra en serie koncentrationer till testbehållarna. Stamlösningens och utspädningsvattnets flödes hastighet bör kontrolleras regelbundet under testets gång, helst dagligen, och får inte variera med mer än 10 % under hela testet. Man bör vara noga med att undvika att använda plaströr av låg kvalitet eller andra material som kan innehålla biologiskt aktiva kemikalier. Vid val av materialet för genomflödestestet bör man beakta möjligheten att testkemikalien eventuellt kan adsorberas till detta material.

Fiskhållning

18. Testfiskarna ska tas från en laboratoriepopulation från en enda stam som under minst två veckor före testets början har aklimatiserats för testet genom att hållas i vatten med samma kvalitet och ljusförhållanden som det som används i testet. Det är viktigt att fisk- och antaltätheten (för definitioner, se tillägg 1) anpassas för de arter som testas (se tillägg 2).
19. Efter en anpassningsperiod på 48 timmar ska dödligheten registreras och följande kriterier tillämpas:
- Om mortaliteten under sju dagar är högre än 10 % av beståndet bör hela beståndet förkastas.
 - Om mortaliteten ligger mellan 5 % och 10 % av beståndet fortsätts aklimatiseringen under ytterligare sju dagar. Om mer än 5 % av beståndet har dött under den andra sjudagarsperioden ska hela beståndet förkastas.
 - Om mortaliteten under sju dagar är lägre än 5 % av beståndet kan beståndet godtas.
20. Fiskarna bör inte ges någon behandling mot sjukdomar under aklimatiseringsperioden, under förexponeringen, eller under exponeringsperioden.

Förexponering och urval av fisk

21. En förexponeringsperiod på en till två veckor rekommenderas då djuren placeras i kärl som liknar de som används i det verkliga testet. Fiskarna bör utfodras ad libitum under hela djurhållningsperioden och under exponeringsfasen. Exponeringen inleds med sexuellt dimorf vuxen fisk från en laboratoriesamling med könsmogna djur (t.ex. med tydligt synbara sekundära könskaraktärer när det gäller knölskallelöja och medaka) som aktivt leker. För allmän vägledning (detta bör inte betraktas isolerat från observationer av ett fiskbestånds faktiska reproduktiva status), bör knölskallelöjorna vara ungefär 20 ($\pm$ 2) veckor gamla, förutsatt att de har odlats vid en temperatur på 25 ± 2 °C under hela sin livstid. Medaka bör vara ungefär 16 ($\pm$ 2) veckor, förutsatt att de har odlats vid en temperatur på 25 ± 2 °C under hela sin livstid. Sebrafiskar bör vara ungefär 16 ($\pm$ 2) veckor, förutsatt att de har odlats vid en temperatur på 26 ± 2 °C under hela sin livstid. Äggproduktionen bör utvärderas dagligen under förexponeringsfasen. Det rekommenderas att lek observeras i alla replikatkärl innan de tas med i testets exponeringsfas. Det är inte möjligt att ge kvantitativ vägledning om önskvärd daglig äggproduktion i detta skede, men det är relativt vanligt att observera genomsnittlig lek på > 10 ägg/hona/dag för varje art. En randomiserad blockutformning baserad på äggproduktionen bör användas för att fördela replikaten till de olika testnivåerna. Syftet är att säkerställa en balanserad fördelning av replikaten.

TESTETS UTFORMNING

22. Tre koncentrationer av testkemikalien, en kontroll (vatten) och, vid behov, en lösningsmedelskontroll används. Uppgifterna kan analyseras för att fastställa statistiskt signifikanta skillnader mellan responsen i behandlingarna och i kontrollen. Dessa analyser kommer att klargöra huruvida ytterligare testning av mer långsiktiga negativa effekter (dvs. överlevnad, utveckling, tillväxt och reproduktion) krävs för kemikalien, snarare än att de används för riskbedömning (25).
23. För sebrafisk undersöks på dag 21 av försöket hanar och honor från varje behandlingsnivå (fem hanar och fem honor i vart och ett av de två replikaten) och från kontrollen eller kontrollerna för mätning av vitellogenin. För medaka undersöks på dag 21 av försöket hanar och honor från varje behandlingsnivå (tre hanar och tre honor i var och en av de fyra replikaten) och från kontrollen eller kontrollerna för mätning av vitellogenin och sekundära könskaraktärer. För knölskallelöja undersöks på dag 21 av exponeringen hanar och honor (två hanar och fyra honor i vart och ett av de fyra replikaten) och från kontrollen eller kontrollerna för mätning av vitellogenin och sekundära könskaraktärer. En kvantitativ bedömning av fruktsamheten krävs, och könskörtelvävnaderna bör fixeras hela eller dissekerade för eventuell histopatologisk utvärdering, om så är nödvändigt.

Val av testkoncentrationer

24. Vid utförandet av detta prov bör den högsta testkoncentrationen fastställas utifrån den högsta tolererade koncentrationen (MTC), vilken bestäms på grundval av ett preliminärt test eller andra uppgifter om toxicitet, eller 10 mg/l, eller högsta löslighet i vatten, beroende på vilket som är lägst. MTC definieras som den högsta testade koncentrationen av testkemikalien som leder till mindre än 10 % dödlighet. Denna metod förutsätter att det finns empiriska uppgifter om akut toxicitet eller toxikologiska uppgifter utifrån vilka MTC kan uppskattas. Uppskattningar av MTC-koncentrationen kan vara otillförlitliga och kräver vanligen ett visst mått av fackmässigt omdöme.
25. För detta krävs tre testkoncentrationer som skiljer sig åt med en konstant faktor som inte överstiger 10 och en kontroll med utspädningsvatten (och en lösningsmedelskontroll vid behov). Ett intervall för spridningsfaktorer på mellan 3,2 och 10 rekommenderas.

FÖRFARANDE

Val och vägning av testfiskarna

26. Det är viktigt att minimera fiskarnas variationer i vikt vid början av testet. I tillägg 2 anges lämpliga storleksintervaller för de arter som rekommenderas för användning i detta test. För hela det fiskbestånd som används i testet bör variationen mellan individernas vikt för hanar och honor vid testets början om möjligt hållas inom $\pm 20\%$ av den aritmetiska medelvikten för samma kön. Det rekommenderas att ett delprov av fiskbeståndet vägs före testet i syfte att uppskatta medelvikten.

Exponeringsförhållanden*Löptid*

27. Testperiodens längd är 21 dagar efter en förexponeringsperiod. Den rekommenderade förexponeringsperioden är en till två veckor.

Utfodring

28. Fiskarna bör utfodras ad libitum med lämpligt foder (tillägg 2) i tillräcklig mängd för att upprätthålla kroppskonditionen. Det är viktigt att se till att det inte uppstår mikrotillväxt eller att vattnet blir grumligt. Som en allmän vägledning kan sägas att den dagliga fodergivan kan delas upp i två eller tre lika stora delar för flera utfodringstillfällen per dag, med minst tre timmar mellan varje utfodring. En enda större giva kan godtas, särskilt under veckosluten. Fiskarna ska inte ges något foder under de tolv timmar som föregår provtagningen/obduktionen.
29. Fiskfodret bör utvärderas med avseende på förekomst av föroreningar såsom bekämpningsmedel som innehåller organiska klorföreningar, polycykliska aromatiska kolväten (PAH) och polyklorerade bifenyl (PCB). Man bör undvika att ge foder som har en hög nivå av fytoöstrogener som kan äventyra testresponsen för kända östrogenagonister (t.ex. 17 β -östradiol).
30. Oätet foder och fekalt material ska avlägsnas från testkärlen minst två gånger i veckan, t.ex. genom omsorgsfull rengöring av akvariets botten med hjälp av en hävert.

Ljus och temperatur

31. Fotoperioden och vattentemperaturen bör vara anpassade för den art som testas (se tillägg 2).

Frekvens för analytiska bestämningar och mätningar

32. Innan exponeringstiden inleds bör man se till att det kemiska tillsatssystemet fungerar på lämpligt sätt. Alla nödvändiga analysmetoder bör fastställas, och man bör ha tillräckliga kunskaper om den kemiska stabiliteten i testsystemet. Under testets gång bestäms testkemikaliens koncentrationer med jämna mellanrum, enligt följande: flödeshastigheten för stamlösningarna med utspädnings- och testämne bör helst kontrolleras dagligen men minst två gånger per vecka, och bör inte variera med mer än 10 % genom hela testet. Det rekommenderas att de faktiska testkoncentrationerna mäts i samtliga kärl vid testets början och därefter varje vecka.
33. Det rekommenderas att resultaten baseras på de uppmätta koncentrationerna. Om koncentrationen av testkemikalien i lösningen på ett tillfredsställande sätt har hållits inom $\pm 20\%$ av den nominella koncentrationen under hela testperioden kan resultaten baseras antingen på nominella eller uppmätta värden.

34. Proverna kan behöva filtreras (t.ex. genom porstorlek 0,45 µm) eller centrifugeras. I sådana fall rekommenderas centrifugering. Om testmaterialet inte adsorberas på filter kan dock även filtrering godtas.
35. Under testet bör halten löst syre, temperaturen och pH-värdet mätas i samtliga kärl minst en gång per vecka. Den totala hårdheten och alkaliniteten bör mätas i kontrollerna och i ett kärl med den högsta koncentrationen minst en gång per vecka. Temperaturen bör helst övervakas kontinuerligt i minst ett testkärl.

Observationer

36. Ett antal allmänna (t.ex. överlevnad) och biologiska responser (t.ex. VTG-nivåer) bedöms under testets gång eller vid testets slut. Daglig kvantitativ övervakning av fruktsamheten krävs. Mätningen och utvärderingen av dessa endpoints och deras användbarhet beskrivs nedan.

Överlevnad

37. Fiskarna bör undersökas en gång per dag under testperioden. All mortalitet bör registreras, och döda fiskar bör avlägsnas så snart som möjligt. Döda fiskar ska inte ersättas, vare sig i kontrollerna eller behandlingskärlen. Könet på de fiskar som dött under testet bör fastställas genom makroskopisk utvärdering av könskörtlarna.

Beteende och utseende

38. Allt onormalt beteende (i jämförelse med kontrollerna) ska registreras. Detta kan omfatta tecken på allmän toxicitet, inklusive hyperventilering, okoordinerat simbeteende, förlust av balansen och atypisk passivitet eller atypiskt ätbeteende. Dessutom bör yttre abnormiteter (t.ex. blödningar eller missfärgning) noteras. Sådana tecken på toxicitet bör övervägas noga vid tolkningen av data eftersom de kan vara tecken på koncentrationer vid vilka biomarkörerna för endokrin aktivitet inte är tillförlitliga. Sådana observationer rörande beteendet kan också tillhandahålla kvalitativ information som påverkar framtida krav för tester på fisk. Till exempel har territoriell aggressivitet observerats hos normala hanar och maskuliniserade honor av knölskallelöja under exponering för androgener, och för sebrafisk har det typiska parnings- och romläggningsbeteendet efter ljusperiodens början vid gryningen reducerats eller fördröjts på grund av exponering för östrogener eller antiandrogener.
39. Eftersom vissa aspekter av utseendet (huvudsakligen färgen) snabbt kan ändras vid hantering är det viktigt att kvalitativa iakttagelser görs innan djuren avlägsnas från testsystemet. Erfarenheterna hittills med knölskallelöja tyder på att vissa endokrint aktiva kemikalier kan till en början åstadkomma förändringar av följande yttre egenskaper: kroppsfärg (ljus eller mörk), färgmönster (förekomst av vertikala strimmor) och kroppsform (huvudet och det pectorala området). Därför bör observationer av fiskarnas fysiska utseende göras under testets gång och vid studiens slut.

Fruktsamhet

40. Dagliga kvantitativa observationer av lek bör registreras per replikat. Äggproduktion bör registreras som antalet ägg/överlevande honor/dag per replikat. Äggen tas bort dagligen från testkärlen. Leks substrat bör placeras i testkärl för knölskallelöja och sebrafisk så att fisken kan leka under normala förhållanden. Tillägg 4 innehåller närmare information om rekommenderade leks substrat för sebrafisk (tillägg 4A) och knölskallelöja (tillägg 4B). Medaka anses inte behöva leks substrat.

Human avlivning av fisk

41. På dag 21, dvs. vid slutet av exponeringen, bör fiskarna avlivas med lämpliga mängder trikain (trikainmetansulfonat, metakain, MS-222 (CAS-nr 886-86-2), 100–500 mg/l buffrat med 300 mg/l NaHCO₃ (natriumvätekarbonat, CAS-nr 144-55-8) för att minska irriterationen på slemhinnorna. Prov tas sedan på blod eller vävnad för bestämning av VTG, så som förklarades i avsnittet om vitellogenin.

Observation av sekundära könskaraktärer

42. Vissa endokrint aktiva kemikalier kan medföra förändringar i särskilda sekundära könskaraktärer (antal parningstuberkler hos knölskallelöjhanar, papillära utväxter hos medakahanar). Framför allt kan kemikalier med vissa verkningsmekanismer ge upphov till en onormal förekomst av sekundära könskaraktärer hos djur av det motsatta könet. Till exempel kan agonister som påverkar androgenreceptorer, såsom trenbolon, metyltestosteron och dihydrotestosteron, göra så att honor av knölskallelöja utvecklar tydliga parningstuberkler och att medakahonor utvecklar papillära utväxter (11, 20, 21). Det har också rapporterats att agonister som påverkar östrogenreceptorer kan minska antalet parningstuberkler och storleken på den dorsala nackvalken hos vuxna hanar av knölskallelöja (26, 27). Sådana makromorfologiska iakttagelser kan tillhandahålla användbar kvalitativ och kvantitativ information som kan påverka eventuella framtida krav för test på fisk. Antalet och storleken på parningstuberkler hos knölskallelöja och de papillära utväxterna hos medaka kan mätas direkt eller mer praktiskt på konserverade exemplar. Rekommenderade förfaranden för utvärdering av sekundära könskaraktärer hos knölskallelöja och medaka finns i bilaga 5A respektive 5B.

Vitellogenin (VTG)

43. Blod samlas in från den kaudala artären/venen med ett hepariniserat mikrohematokrit-centrifugerat kapillärrör, eller alternativt genom hjärtpunktering med en spruta. Beroende på fiskens storlek kan man i allmänhet samla in mellan 5–60 µl blod per individ för knölskallelöja, och 5–15 µl per individ för sebrafisk. Plasman avskiljs från blodet genom centrifugering och lagras med proteashämmare vid –80 °C tills de analyseras med avseende på VTG. Alternativt använder man levern hos medaka, och för sebrafiskar kan huvud/stjärthomogenatet användas som vävnadskälla för bestämning av VTG (tillägg 6). Mätningen av VTG bör baseras på en validerad homolog ELISA-metod med användning av en homolog VTG-standard och homologa antikroppar. Det rekommenderas att man använder en metod som kan påvisa VTG-nivåer som är så låga som ett fåtal ng/ml plasma (eller ng/mg vävnad), vilket är bakgrunds-nivån hos oexponerade hanfiskar.
44. Kvalitetskontrollen av VTG-analysen genomförs med hjälp av standarder, blankprov och minst duplikatanalys. För varje ELISA-metod bör ett test för matriseffekt (effekten av provutspädning) genomföras för att bestämma den minsta utspädningsfaktorn för proven. Varje ELISA-platta som används för VTG-tester bör omfatta följande kvalitetskontrollprov: minst sex kalibreringsstandarder som täcker intervallet för de väntade VTG-koncentrationerna, och minst ett icke-specifikt blankprov för bindingsbestämning (som analyseras i två exemplar). Absorbansen i dessa blankprov bör vara mindre än 5 % av den högsta absorbansen i kalibreringsstandarderna. Minst två alikvoter (brunnsduplikat) av varje provutspädning analyseras. Brunnsduplikat som avviker med mer än 20 % bör analyseras på nytt.
45. Korrelationskoefficienten (R^2) för kalibreringskurvor ska vara högre än 0,99. En hög korrelation är dock inte tillräcklig för att garantera en adekvat prediktion av koncentrationerna inom alla intervaller. Förutom att kalibreringskurvan har en tillräckligt hög korrelationsgrad bör koncentrationen för varje standard, som beräknats utifrån kalibreringskurvan, ligga på mellan 70 och 120 % av dess nominella koncentration. Om de nominella koncentrationerna tenderar att avvika från kalibreringens regressionslinje (t.ex. vid lägre koncentrationer) kan det vara nödvändigt att dela upp kalibreringskurvan i låga respektive höga intervaller eller att använda en icke-linjär modell som gör att absorbansdata kan passas in på ett lämpligt sätt. Om kurvan delas upp bör $R^2 > 0,99$ gälla för båda linjesegmenten.
46. Detektionsgränsen (LOD) definieras som koncentrationen i den lägsta analytiska standarden, och gränsen för kvantifiering (LOQ) definieras som koncentrationen i den lägsta analytiska standarden multiplicerad med den lägsta utspädningsfaktorn.
47. Varje dag som VTG-tester utförs ska ett berikningsprov analyseras som beretts med en referensstandard för tester mellan laboratorier (tillägg 7). Förhållandet mellan den förväntade koncentrationen och den uppmätta koncentrationen rapporteras tillsammans med resultaten från varje försöksomgång som utförs på samma dag.

Utvärdering av histopatologiska undersökningar av könskörtlar

48. Tillsynsmyndigheterna kan kräva histopatologiska undersökningar av könskörtlarna för att studera målorganet på HPG-axeln efter kemisk exponering. Könskörtlarna fixeras antingen hela eller dissekeras. När en histopatologisk undersökning krävs tittar man på särskilda hormonrelaterade responser i könskörtlarna inom ramen för bedömningen av testkemikalens endokrina aktivitet. Dessa diagnostiska responser omfattar huvudsakligen förekomsten av oocyter i testiklarna, Leydig-cellhyperplasi, minskad äggulebildning, ökade spermatogonier och perifollikulär hyperplasi. Andra skador på könskörtlarna, t.ex. oocyter i atresi, degenerering av testiklarna och stadieförändringar, kan ha olika orsaker. Vägledningsdokumentet om histopatologiska undersökningar av könskörtlar hos fiskar innehåller förfaranden för dissekering, fixering, uppdelning och histopatologisk utvärdering av könskörtlar (22).

DATA OCH RAPPORTERING

Utvärdering av biomarkörresponser med variansanalys (ANOVA)

49. För att identifiera en kemikalies potentiella aktivitet jämförs responser mellan behandlings- och kontrollgrupperna med hjälp av variansanalys (ANOVA). Om en lösningsmedelskontroll används bör ett lämpligt statistiskt test utföras mellan utspädningsvatten- och lösningsmedelskontrollerna för varje endpoint. Vägledning om hur man ska hantera data rörande utspädningsvatten- och lösningsmedelskontrollerna i den efterföljande statistiska analysen finns i OECD, 2006c (28). Alla biologiska responsdata bör analyseras och rapporteras separat per kön. Om de antaganden som krävs för parametriska metoder inte uppfylls – onormal fördelning (t.ex. Shapiro-Wilks test) eller heterogen varians (Bartlett's test eller Levenes test) – bör man överväga att homogenisera varianserna genom transformering av data före ANOVA utförs. Alternativt kan en viktad ANOVA övervägas. Dunnetts test (parametriserade) på en eller flera parvisa jämförelser eller Mann-Whitneys test med parametrisk justering (Bonferroni) kan användas för icke-monotona dos-responser. Andra statistiska tester kan användas (t.ex. Jonckheere-Terpstras test eller Williams test) om dos-responsern är ungefärligen monoton. Det statistiska flödesschemat i bilaga 8 kan vara till hjälp när man beslutar vilket statistiskt test som är det mest ändamålsenliga att använda. Ytterligare information kan också erhållas från OECD:s dokument Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data (28).

Rapportering av testresultat

50. Studiedata bör inbegripa följande:

Testanläggning:

- ansvarig personal och deras studieansvar,
- varje laboratorium ska ha demonstrerat sina kunskaper i användningen av ett antal representativa kemikalier.

Testkemikalie:

- karakterisering av testkemikalien,
- fysikalisk form och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,
- metod för beredning av testkoncentrationerna och hur ofta detta sker,
- information om stabilitet och biologisk nedbrytbarhet.

Lösningsmedel:

- karakterisering av lösningsmedlet (beskaffenhet, använd koncentration),
- motivering av valet av lösningsmedel (om annat än vatten).

Försöksdjur:

- art och stam,
- leverantör och specifik leverantörsanläggning,
- fiskens ålder vid testets början och dess reproduktiva status samt lekstatus,
- uppgifter om förfarandet för aklimatisering av djuren,
- fiskens kroppsvikt vid början av exponeringen (från ett delprov av fiskbeståndet).

Testbetingelser:

- testförfarande som har använts (typ av test, fisktäthet, antalstäthet, osv.),
- metod för beredning av stamlösningar och flödes hastighet,
- nominella testkoncentrationer, uppmätta koncentrationer av testlösningarna varje vecka och den använda analysmetoden, medelvärden av de uppmätta värdena och standardavvikelserna i testkärnen samt bevis för att mätningarna hänförs till testkemikalien koncentrationer i en äkta lösning,
- utspädningsvattnets egenskaper (t.ex. pH, hårdhet, alkalinitet, temperatur, halten löst syre, restklornivåer, halten organiskt kol, uppslammade partiklar och eventuella andra gjorda mätningar),
- vattenkvaliteten i testkärnen: pH, hårdhet, temperatur och halten löst syre,
- detaljerade uppgifter om utfodringen (t.ex. typ av foder, källa, hur mycket fiskarna har fått och hur ofta samt, om möjligt, en analys av relevanta förorenande ämnen (t.ex. PCB, polycykliska aromatiska kolväten och bekämpningsmedel som innehåller organiska klorföreningar).

Resultat

- bevis för att kontrollerna uppfyller testets godkännandekriterier,
- uppgifter om dödlighet i alla koncentrationer och i kontrollen,
- de statistiska analysmetoder som har använts, behandlingen av data och motivering av de tekniker som har använts,
- uppgifter om biologiska observationer av makromorfologi, inklusive sekundära könsskarakterer, äggproduktion och VTG,
- resultaten av dataanalyserna, helst i tabellform och grafisk form,
- förekomsten av eventuella ovanliga reaktioner hos fiskarna och eventuella synliga effekter som har orsakats av testkemikalien.

RIKTLINJER FÖR TOLKNING OCH GODKÄNNANDE AV TESTRESULTATEN

51. Detta avsnitt innehåller några överväganden som ska beaktas vid tolkningen av testresultaten för de olika endpoints som uppmätts. Resultaten bör tolkas med försiktighet när testkemikalien förefaller orsaka uppenbar toxicitet eller inverka på försöksdjurens allmäntillstånd.
52. När man fastställer intervallet för testkoncentrationerna bör man vara noga med att inte överskrida den högsta tolererade koncentrationen för att möjliggöra en meningsfull tolkning av data. Det är viktigt att ha minst en behandling där det inte finns några tecken på toxiska effekter. Tecken på sjukdom och tecken på toxiska effekter bör utvärderas noggrant och rapporteras. Det är till exempel möjligt att produktionen av VTG hos honor även kan påverkas av den allmänna toxiciteten och av icke-endokrina toxiska verkningsmekanismer, t. ex. hepatotoxicitet. Tolkningen av effekterna kan dock stärkas av andra behandlingsnivåer på vilka effekterna inte kompliceras av systemisk toxicitet.

53. Det finns en del aspekter som ska beaktas vid godkännandet av testresultaten. Som vägledning bör VTG-nivåerna i kontrollgrupperna med hanar och honor vara klart avgränsade och åtskilda med omkring tre storleksordningar för knölskallelöja och sebrafisk, och med ungefär en storleksordning för medaka. Exempel på intervallerna för de värden som påträffats i kontroll- och behandlingsgrupperna finns i valideringsrapporterna (1, 2, 3, 4). Höga VTG-värden hos hanar i kontrollen skulle kunna äventyra testresponsen och testets förmåga att påvisa svaga östrogenagonister. Låga VTG-värden hos honor i kontrollen skulle kunna äventyra testresponsen och testets förmåga att påvisa aromatashämmare och östrogenantagonister. Valideringsstudierna användes för att utarbeta dessa riktlinjer.
54. När det gäller kvantifieringen av äggproduktionen kan den uppvisa stora variationer [variationskoefficienten (CV) kan sträcka sig från 20 % till 60 %]. Detta påverkar möjligheterna att genom analysen detektera en signifikant minskning i äggproduktionen som är mindre än 70 %, allteftersom CV närmar 50 % eller mer. När CV begränsas till lägre värden (cirka 20–30 %) ger analysen en godtagbar effekt (80 %) för att detektera en minskning på 40–50 % i äggproduktionen. Den testmetod som används för knölskallelöja, inklusive fyra replikat per behandlingsnivå, bör ge större styrka för endpointen fruktsamhet, jämfört med en testmetod med endast två replikat.
55. Om ett laboratorium inte har utfört testet tidigare eller väsentliga förändringar (t.ex. förändringar av fiskstammen eller leverantören) har gjorts är det lämpligt att en teknisk kompetensstudie utförs. Det rekommenderas att man använder kemikalier som omfattar en rad olika verkningsmekanismer eller som påverkar ett antal olika endpoints. I praktiken uppmuntras varje laboratorium att samla in egna historiska kontrolldata för hanar och honor och att utföra ett test med en positiv kontrollkemikalie för östrogenaktivitet (t.ex. 17-beta-estradiol vid 100 ng/l, eller en känd svag agonist) som leder till ökade VTG-nivåer i hanfiskar, en positiv kontrollkemikalie för aromatashämmande effekter (t.ex. fadrozol eller prokloraz vid 300 µg/l) som leder till minskade VTG-nivåer hos honfiskar, och en positiv kontrollkemikalie för androgen aktivitet (t.ex. 17-beta-trenbolon vid 5 µg/l), som leder till induktion av sekundära könskaraktärer hos honor av knölskallelöja och medaka. Alla dessa data kan jämföras med tillgängliga data från valideringsstudierna (1, 2, 3) för att säkerställa laboratoriekompetensen.
56. I allmänhet bör VTG-mätningar anses vara positiva om det finns en statistiskt signifikant ökning av VTG hos hanar ($p < 0,05$), eller en statistiskt signifikant minskning hos honor ($p < 0,05$), åtminstone vid den högsta testdosen jämfört med kontrollgruppen och i avsaknad av tecken på allmän toxicitet. Ett positivt resultat bekräftas ytterligare om man kan påvisa ett biologiskt sannolikt samband mellan dosen och responskurvan. Som nämndes tidigare behöver inte minskningen av VTG uteslutande bero på endokrina orsaker. I allmänhet bör ett positivt resultat dock tolkas som bevis för endokrin aktivitet in vivo, och normalt bör man då vidta åtgärder för ytterligare klargöranden.
57. Tillsynsmyndigheterna kan kräva utvärdering av histopatologiska undersökningar av könskörtlarna för att fastställa försöksdjurens reproduktiva lämplighet och möjliggöra en sammanvägd bedömning av testresultaten. Histopatologisk undersökning av könskörtlarna kanske inte är nödvändig i fall där antingen VTG eller de sekundära könskaraktärerna är positiva (dvs. en ökning eller minskning av VTG eller induktion av sekundära könskaraktärer).

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 nr 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 nr 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 nr 78, Paris.

- (4) Owens, J. W. (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> (hämtad 18 september 2008).
- (5) U.S. EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15 december 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. s. 104.
- (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 nr 94, Paris.
- (7) Sumpter JP och S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*, 103 Suppl 7:173–178 Review.
- (8) Pawlowski S., m.fl. (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, 277–291.
- (9) Andersen L., m.fl. (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, 343–352.
- (10) Ankley GT, m.fl. (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*, 67(1):121–130.
- (11) Panter G.H., m.fl. (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) Parker L.G., m.fl. (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):113–125.
- (13) Panter G.H., m.fl. (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, Bryssel, Belgien.
- (14) Fenske M., m.fl. (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., m.fl. (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., m.fl. (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 131: 531–539.
- (17) Brion F., m.fl. (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., m.fl. (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., m.fl. (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., m.fl. (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., m.fl. (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 nr 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. Nr 23. Paris.
- (24) Hutchinson T.H., m.fl. (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76, s. 69–92.
- (25) Hutchinson T.H., m.fl. (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., m.fl. (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., m.fl. (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 nr 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. s. 110 ff.
- (30) OECD (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disruptors*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 150, OECD, Paris.
-

Tillägg 1

FÖRKORTNINGAR OCH DEFINITIONER

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

CV: variationskoefficient

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

HPG-axel: stressaxeln, bestående av hypotalamus, hypofysen och binjurebarken.

Fisktäthet: våtvikten fisk per vattenvolym.

MTC: den högsta tolererade koncentrationen, dvs. ungefär 10 % av LC_{50} .

Antalstäthet: antalet exemplar per vattenvolym.

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

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

Tillägg 2

FÖRSÖKSBETINGELSER FÖR ENDOKRINT SCREENINGTEST PÅ FISK

1. Rekommenderade arter	Knölskallelöja (<i>Pimephales promelas</i>)	Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	Sebrafisk (<i>Danio rerio</i>)
2. Testtyp	Genomflödestest	Genomflödestest	Genomflödestest
3. Vattentemperatur	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Belysningstyp	Fluorescerande lampor (brett spektrum)	Fluorescerande lampor (brett spektrum)	Fluorescerande lampor (brett spektrum)
5. Ljusintensitet	10–20 µE/m ² /s, 540–1000 lux, eller 50–100 ft-c (omgivande ljusnivåer i laboratoriet)	10–20 µE/m ² /s, 540–1000 lux, eller 50–100 ft-c (omgivande ljusnivåer i laboratoriet)	10–20 µE/m ² /s, 540–1000 lux, eller 50–100 ft-c (omgivande ljusnivåer i laboratoriet)
6. Ljusperiod (övergångar mellan gryning och skymning är frivilliga, men anses inte vara nödvändiga)	16 timmar ljus, 8 timmar mörker	12–16 timmar ljus, 12–8 timmar mörker	12–16 timmar ljus, 12–8 timmar mörker
7. Fisktäthet	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Testbehållarens storlek	Minst 10 l	Minst 2 l	Minst 5 l
9. Testlösningens volym	Minst 8 l	Minst 1,5 l	Minst 4 l
10. Volymutbyte av testlösningar	Minst 6 per dag	Minst 5 per dag	Minst 5 per dag
11. Testorganismernas ålder	Se punkt 21	Se punkt 21	Se punkt 21
12. Ungefärlig våtvikt för en vuxen fisk (g)	Honor: 1,5 ± 20 % Hanar: 2,5 ± 20 %	Honor: 0,35 ± 20 % Hanar: 0,35 ± 20 %	Honor: 0,65 ± 20 % Hanar: 0,4 ± 20 %
13. Antal fiskar per testkär	6 (2 hanar och 4 honor)	6 (3 hanar och 3 honor)	10 (5 hanar och 5 honor)
14. Antal behandlingar	= 3 (plus lämpliga kontroller)	= 3 (plus lämpliga kontroller)	= 3 (plus lämpliga kontroller)
15. Antal kär	Minst 4	Minst 4	Minst 2
16. Antal fiskar per testkoncentration	16 vuxna honor och 8 hanar (4 honor och 2 hanar i varje replikatker)	12 vuxna honor och 12 hanar (3 honor och 3 hanar i varje replikatker)	10 vuxna honor och 10 hanar (5 honor och 5 hanar i varje replikatker)

17. Utfodring	Levande eller frysta vuxna eller nauplier av <i>Artemia</i> två eller tre gånger dagligen (ad libitum), kommersiellt tillgängligt foder eller en blandning av dessa	<i>Artemia</i> -nauplier två eller tre gånger dagligen (ad libitum), kommersiellt tillgängligt foder eller en blandning av dessa	<i>Artemia</i> -nauplier två eller tre gånger dagligen (ad libitum), kommersiellt tillgängligt foder eller en blandning av dessa
18. Luftning	Ingen såvida inte koncentrationen löst syre sjunker under 60 % luftmättnad	Ingen såvida inte koncentrationen löst syre sjunker under 60 % luftmättnad	Ingen såvida inte koncentrationen löst syre sjunker under 60 % luftmättnad
19. Utspädningsvatten	Rent yt- eller brunnsvatten, rekonstituerat vatten eller avklorerat kranvatten	Rent yt- eller brunnsvatten, rekonstituerat vatten eller avklorerat kranvatten	Rent yt- eller brunnsvatten, rekonstituerat vatten eller avklorerat kranvatten
20. Föreponeringstid	7–14 dagar rekommenderas	7–14 dagar rekommenderas	7–14 dagar rekommenderas
21. Den kemiska exponeringens varaktighet	21-d	21-d	21-d
22. Biologiska endpoints	— överlevnad — beteende — fruktsamhet — sekundära könskaraktärer — VTG — eventuellt histopatologi av könskörtlarna	— överlevnad — beteende — fruktsamhet — sekundära könskaraktärer — VTG — eventuellt histopatologi av könskörtlarna	— överlevnad — beteende — fruktsamhet — VTG — eventuellt histopatologi av könskörtlarna
23. Testets godkännandekriterier	Löst syre ≥ 60 % av luftmättnadsvärdet, medeltemperatur 25 ± 2 °C, 90 % överlevnad i kontrollerna, uppmätta testkoncentrationer inom 20 % av medelvärdet för de uppmätta värdena per behandlingsnivå.	Löst syre ≥ 60 % av luftmättnadsvärdet, medeltemperatur 25 ± 2 °C, 90 % överlevnad i kontrollerna, uppmätta testkoncentrationer inom 20 % av medelvärdet för de uppmätta värdena per behandlingsnivå.	Löst syre ≥ 60 % av luftmättnadsvärdet, medeltemperatur 26 ± 2 °C, 90 % överlevnad i kontrollerna, uppmätta testkoncentrationer inom 20 % av medelvärdet för de uppmätta värdena per behandlingsnivå.

Tillägg 3

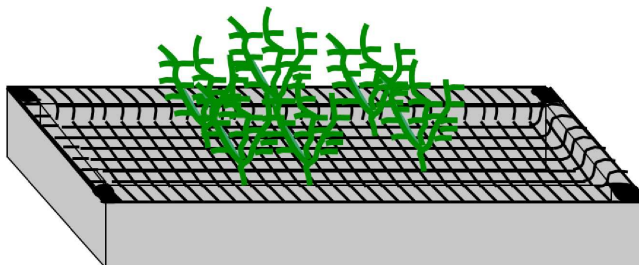
NÅGRA KEMISKA EGENSKAPER FÖR GODTAGBART UTSPÄDNINGSVATTEN

KOMPONENT	KONCENTRATIONER
Partiklar	< 20 mg/l
Halt av organiskt kol	< 2 mg/l
Icke-joniserad ammoniak	< 1 µg/l
Resterande mängd klor	< 10 µg/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska fosforföreningar	< 50 ng/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska klorföreningar plus polyklorerade bifenyler	< 50 ng/l
Total mängd organiskt klor	< 25 ng/l

Tillägg 4A

LEKSUBSTRAT FÖR SEBRAFISK

Lekskål: en instrumentskål av glas, t.ex. 22 × 15 × 5,5 cm (längd × bredd × djup), täckt med ett avtagbart trådgaller av rostfritt stål (maskstorlek 2 mm). Gallret bör täcka instrumentskålens öppning på en nivå som ligger under kanten.



På gallret bör man fästa ett leksubstrat. Det ger fiskarna en struktur som de kan simma in i. Konstgjorda akvarieväxter av grön plast är till exempel lämpliga (Obs! man bör beakta möjligheten att testkemikalien adsorberas till plastmaterialet). Plastmaterialet bör lakas ut i en tillräcklig volym med varmt vatten under tillräckligt lång tid för att säkerställa att inga kemikalier läcker ut i testvattnet. Vid användning av material av glas bör man se till att fiskarna varken skadas eller trängs under sina energiska aktiviteter.

Avståndet mellan skålen och glastrutorna bör vara minst 3 cm för att säkerställa att fiskarna inte leker utanför skålen. Den rom som läggs på uppsamlingsbrickan faller ner genom gallret och kan samlas in 45–60 minuter efter att belysningen tänts. De genomskinliga äggen är inte vidhäftande och kan lätt räknas i transversellt ljus. Om man använder fem honor per kärl kan äggantal på under 20 per dag räknas som ett lågt, upp till 100 som ett genomsnittligt och mer än 100 som ett högt antal. Lekskålen bör tas bort, äggen samlas in och lekskålen återinföras i testkärlet antingen så sent som möjligt på kvällen eller mycket tidigt på morgonen. Tiden fram till återinförandet bör inte överstiga en timme. I annat fall kan leksubstratet som trigger framkalla individuell parning och lek på ovanliga tider. Om situationen kräver ett senare införande av lekskålen bör detta göras tidigast nio timmar efter att belysningen har tänts. Vid denna sena tidpunkt på dagen framkallas inte lekbeteendet längre.

Tillägg 4B

LEKSUBSTRAT FÖR KNÖLSKALLELÖJA

Två eller tre kombinerade lekplattor och -skålar av keramik/plast/glas eller rostfritt stål placeras i varje testbehållare (t.ex. en 80 mm lång grå halvcirkelformad ränna i en 130 mm lång skål med uppvikt kant) (se bilden). Korrekt härdad PVC eller keramiska plattor har visat sig vara lämpliga som leksubstrat (Thorpe m.fl., 2007).

Det rekommenderas att plattorna är nötta för att förbättra vidhäftningen. Skålen bör också avskärmas för att förhindra fiskarna från att komma åt de lagda äggen såvida inte äggens vidhäftningsförmåga har påvisats för det leksubstrat som används.



Basen är utformad för att samla upp alla ägg som inte fastnar på plattans yta och därför annars skulle falla till akvariets botten (eller de ägg som läggs direkt på den platta plastbasen). Alla leksubstrat bör lakas ur i utspädningsvatten under minst tolv timmar före användning.

Thorpe, K. L., Benstead, R., Hutchinson, T.H och Tyler C. R. (2007). An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology* 81, 90–98.

Tillägg 5A

**BEDÖMNING AV SEKUNDÄRA KÖNSKARAKTÄRER HOS KNÖLSKALLELÖJA FÖR PÅVISANDE AV
VISSA ENDOKRINT AKTIVA KEMIKAlier****Översikt**

Potentiellt viktiga kännetecken för det fysiska utseendet hos vuxna knölskallelöjor i tester av hormonstörande ämnen omfattar kroppsfärgen (dvs. ljus/mörk), färgmönster (dvs. förekomst eller avsaknad av vertikala strimmor), kroppsformen (dvs. formen på huvudet och det pectorala området, uttänjd buk), och särskilda sekundära könskaraktärer (dvs. parningstuberklernas antal och storlek, storleken på nackvalken och ägglägningsröret).

Parningstuberklerna återfinns på huvudet (nackvalken) på reproduktivt aktiva hanar av knölskallelöja, och sitter normalt i ett bilateralt symmetriskt mönster (Jensen m.fl., 2001). Kontrollhonor och unga hanar och honor utvecklar inte några tuberkler (Jensen m.fl., 2001). Det kan förekomma upp till åtta enskilda tuberkler runt ögonen och mellan hanarnas luktgropar. Det flesta och största tuberklerna är belägna i två parallella linjer omedelbart under luktgroparna och ovanför munnen. Många fiskar har grupper av tuberkler under underkäken. De som sitter närmast munnen förekommer i regel som ett enda par, medan de som är belägna mer ventralt kan bestå av upp till fyra tuberkler. Det faktiska antalet tuberkler är sällan mer än 30 (intervall 18–28, Jensen m.fl., 2001). De mest framträdande tuberklerna (mätt i antal) utgörs av en enda, relativt rund struktur med en höjd som ungefär motsvarar radien. De flesta reproduktivt aktiva hanar har också åtminstone några tuberkler som är förstörade och framträdande på ett sådant sätt att de inte kan särskiljas som enskilda strukturer.

Vissa typer av endokrinstörande kemikalier kan förorsaka abnorma förekomster av vissa sekundära könskaraktärer hos det motsatta könet. Agonister som påverkar androgenreceptorer, såsom 17 α -metylttestosteron eller 17 β -trenbolon, kan göra så att honor av knölskallelöja utvecklar tydliga parningstuberkler (Smith 1974, Ankley m.fl., 2001, 2003), medan agonister som påverkar östrogenreceptorer kan minska parningstuberklernas antal eller storlek hos hanar (Miles-Richardson m.fl., 1999, Harries m.fl., 2000).

Nedan följer en redogörelse av karakteriseringen av parningstuberkler hos knölskallelöja på grundval av de förfaranden som används vid USA:s Environmental Protection Agency i Duluth, Minnesota. Särskilda produkter och/eller utrustning kan ersättas med tillgängliga jämförbara material.

Fiskarna kan bäst observeras med hjälp av ett belyst förstoringsglas eller i ett belyst dissekeringsmikroskop med 3x förstoring. Observera fiskarna dorsalt och med den främre delen framåt (huvudet mot betraktaren).

- Placera fisken i liten petriskål (t.ex. 100 mm i diameter), med främre delen framåt och buksidan nedåt. Fokusera sökaren för att göra det möjligt att identifiera tuberklerna. Rulla långsamt och försiktigt fisken från sida till sida för att identifiera tuberkelområdena. Räkna och klassificera tuberklerna.
- Upprepa observationen på den ventrala huvudytan genom att placera fisken på ryggen med huvudet framåt i petriskålen.
- Observationerna bör göras inom två minuter för varje fisk.

Tuberkelräkning och klassificering

Sex särskilda områden har fastställts för bedömning av förekomsten och utvecklingen av tuberkler hos vuxna knölskallelöjor. En mall har utarbetats för att kartlägga var och i vilket antal tuberklerna förekommer (se slutet av detta tillägg). Antalet tuberkler registreras och deras storlek rangordnas kvantitativt enligt följande: 0–saknas, 1–förekommer, 2–förstörad och 3–framträdande, för varje organism (figur 1).

Klassificering 0–saknas: avsaknad av tuberkler. Klassificering 1–förekommer: definieras som alla tuberkler som har en enda punkt vars höjd är nästan lika med dess radie. Klassificering 2–förstörad: definieras som en vävnad som liknar en asterisk, vanligtvis med en stor radial bas med räfflor eller fåror som utgår från medelpunkten. På höjden är tuberkeln ofta mer taggig men kan ibland vara något avrundad. Klassificering 3–framträdande: refererar till vanligtvis ganska stora och rundade tuberkler med mindre avgränsad struktur. Ibland växer dessa tuberkler ihop och utgör en enda massa längs ett enskilt område eller en kombination av områden (B, C och D enligt beskrivning nedan). Färgen och utformningen liknar dem för klassificering 2 men är ibland ganska godtyckliga. Med hjälp av detta klassificeringssystem får man i allmänhet ett totalt tuberkelpoängsvärde på < 50 för en normal kontrollhane som har 18–20 tuberkler (Jensen m.fl., 2001).

Figur 1



Det faktiska antalet tuberkler hos vissa fiskar kan vara större än antalet mallrutor för ett visst klassificeringsområde. Om detta är fallet kan ytterligare klassificeringsnummer läggas till inom, till höger eller till vänster om rutan. Mallen måste därför inte vara symmetrisk. Ytterligare en metod för kartläggning av tuberkler som sitter ihop två och två eller vertikalt längs munnens horisontalplan är att dubbelmarkera två tuberkelklassificeringspoäng i en enda ruta.

Kartläggningsregioner:

A – Tuberkler belägna runt ögat. Kartläggs från rygg till buk runt främre kanten på ögat. Vanligtvis i flertal hos fullt utvecklade kontrollhanar, saknas hos kontrollhonor, vanligtvis parvis (en nära varje öga) eller i ental hos honor som exponerats för androgener.

B – Tuberkler belägna mellan luktroparna (sinneskanalporer). Vanligtvis parvis hos kontrollhanar vid mer förhöjda utvecklingsnivåer (2-förstorad eller 3-framträdande). Saknas hos kontrollhonor med viss förekomst och utveckling hos honor som exponerats för androgener.

C – Tuberkler belägna omedelbart framför luktroparna, parallellt med munnen. I allmänhet förstorade eller framträdande hos fullt utvecklade kontrollhanar. Förekommer eller förstorade hos mindre utvecklade hanar eller androgenbehandlade honor.

D – Tuberkler belägna parallellt med munlinjen. I allmänhet klassificeras dessa som "utvecklade" hos kontrollhanar. Saknas hos kontrollhonor men förekommer hos androgenexponerade honor.

E – Tuberkler belägna på underkäken, nära munnen, vanligtvis små och vanligen i par. Varierar hos kontrollhanar och behandlade hanar samt behandlade honor.

F – Tuberkler belägna ventralt jämfört med E. Vanligen små och i par. Förekommer hos kontrollhanar och androgenexponerade honor.

LITTERATURHÄNVISNINGAR

- (1) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Korte, J. J. och Makynen, M. E. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20, 1276–1290.
- (2) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Makynen, E. A., Kahl, M. D., Korte, J. J., Hornung, M. W., Henry, T. R., Denny, J. S., Leino, R. L., Wilson, V. S., Cardon, M. C., Hartig, P. C. och Gray, E. L. 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, J. E., Runnalls, T., Hill, E., Harris, C. A., Maddix, S., Sumpter, J. P. och Tyler, C. R. 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, K. M., Korte, J. J., Kahl, M. D., Pasha, M. S. och Ankley, G. T. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp Biochem Physiol C* 128, 127–141.
- (5) Kahl, M. D., Jensen, K. M., Korte, J. J. och Ankley, G. T. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59, 515–523.
- (6) Miles-Richardson, S. R., Kramer, V. J., Fitzgerald, S. D., Render, J. A., Yamini, B., Barbee, S. J. och Giesy, J. P. (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, R. J. F. 1974. Effects of 17 α -methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can J Zool* 52, 1031–1038.

Tuberkelmall:

ID _____

Date _____

Poäng totalt _____

Klassificering

1- förekommer

2- förstörad

3- framträdande

	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

Tillägg 5B

BEDÖMNING AV SEKUNDÄRA KÖNSKARAKTÄRER HOS MEDAKA FÖR PÅVISANDE AV VISSA ENDOKRINT AKTIVA KEMIKALIER

Nedan följer en redogörelse av mätningen av de papillära utväxter (*) som utgör de sekundära könskaraktärerna hos medaka (*Oryzias latipes*).

- (1) Efter avlägsnandet av levern (tillägg 6) ska kroppen placeras i en konisk tub innehållande ca 10 ml 10 % neutralt buffrat formalin (huvudet uppåt, stjärten nedåt). Om könskörteln fixeras i en annan lösning än 10 % neutralt buffrat formalin lägger man ett transversellt snitt över kroppen mellan den främre delen av analfenan och anus med ett rakblad, samtidigt som man undviker att skada gonoporen och könskörteln i sig (figur 3). Placera den kraniala delen av fiskkroppen i fixeringslösningen för att bevara könskörteln, och stjärtdelen av fiskkroppen i 10 % neutralt buffrat formalin enligt beskrivning ovan.
- (2) Efter att fiskkroppen placerats i 10 % neutralt buffrat formalin fattar man tag i analfenans främre del med en pincett och viker den i ca 30 sekunder så att analfenan hålls utspänd. När man lyfter upp analfenan med pincetten bör man försiktigt fatta tag i den främre delen så att man inte skadar de papillära utväxterna.
- (3) Efter att analfenan hållits utspänd i ca 30 sekunder bevaras fiskkroppen i 10 % neutralt buffrat formalin vid rumstemperatur fram till mätningen av de papillära utväxterna (mätningen ska utföras efter fixering i minst 24 timmar).

Mätning

- (1) Fiskkroppen fixeras i 24 % neutralt buffrat formalin i minst 24 timmar. Ta därefter upp fiskkroppen ur den koniska tuben och torka av formalinet på filterpapper (eller en pappersservett).
- (2) Lägg fisken med buksidan upp. Skär sedan försiktigt av analfenan med en liten dissektionssax (det är lämpligt att skära av analfenan tillsammans med en liten bit vävnad från fenfästet (pterygiofor).
- (3) Fatta tag i den främre delen av den avskurna analfenan med en pincett och lägg den på ett objektglas med flera droppar vatten. Täck därefter analfenan med ett täckglas. Var noga med att inte skada de papillära utväxterna när analfenan hålls fast med pincetten.
- (4) Räkna antalet ledplattor med papillära utväxter med hjälp av räknaren under ett biologiskt mikroskop (upprätt eller inverterat mikroskop). De papillära utväxterna kan kännas igen på en liten bildning av utväxter som är synbar på den bakre kanten av fenstrålen. Skriv in antalet ledplattor med papillära utväxter på varje fenstråle i tabellen (t.ex. första fenstrålen: 0, andra fenstrålen: 10, tredje fenstrålen: 12 osv.), och skriv in summan av dessa antal i Excel-tabellen per enskild fisk. Vid behov kan man fotografera analfenan och räkna antalet ledplattor med papillära utväxter på fotot.
- (5) Efter mätningen läggs analfenan i den koniska tuben som beskrivs i (1) och bevaras.

(*) Papillära utväxter förekommer normalt endast hos vuxna hanar och påträffas på den andra till den sjunde eller åttonde fenstrålen räknat från analfenans bakre kant (figur 1 och 2). Utväxterna förekommer sällan på den första fenstrålen från analfenans bakre kant. Detta standardförfarande omfattar mätning av utväxter på den första fenstrålen (fenstrålarna räknas i ordningsföljd från analfenans bakre kant i detta standardförfarande).

Fig.1.

Diagram som visar könsskillnaden i analfenans storlek och form. A, hane, B, hona. Oka, T. B., 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.

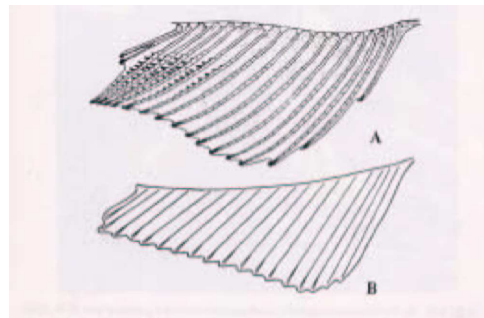


Fig.2.

A, Utväxter på fenstrålarnas ledplattor i analfenan. J.P. = ledplatta, A.S. = axelavstånd, P. = utväxt. B, Fenstrålens distala ände. Aktinotrikierna (Act.) sitter på spetsen. Oka, T. B., 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.

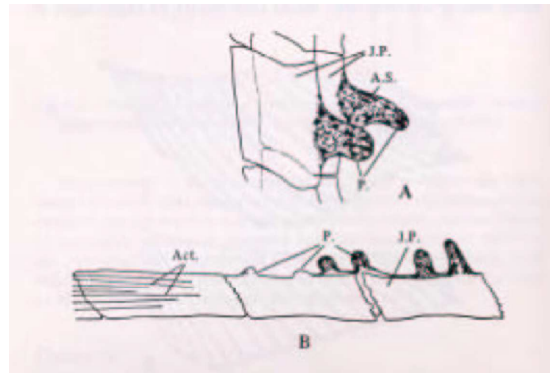
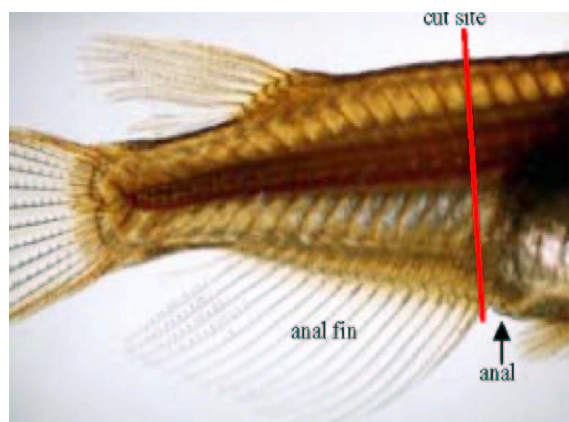


Fig.3.

Fotografi av fiskkropp som visar var snittet ska läggas när könskörteln fixeras i en annan fixeringslösning än 10 % neutralt buffrat formalin. I detta fall ska den övriga kroppen skäras av mellan analfenans främre kant och analöppningen med ett rakblad (röd linje), och fiskkroppens huvudsida läggs sedan i samma fixeringslösning som könskörteln och stjärtsidan läggs i 10 % neutralt buffrat formalin.



Tillägg 6

REKOMMENDERADE FÖRFARANDE FÖR PROVTAGNING FÖR VITELLOGENINANALYS

Man bör vara noga med att undvika korskontaminering mellan VTG-prover från hanar och honor.

Förfarande 1A: Knölskallelöja, insamling av blod från stjärtvenen/-artären

Efter bedövning skärs stjärtspolen delvis av med en skalpell och blod samlas från den kaudala venen/artären med ett hepariniserat mikrohematokrit-centrifugerat kapillärrör. Efter att blodet har samlats in isoleras plasman snabbt genom centrifugering vid 15 000 g i 3 minuter (eller vid 15 000 g i 10 minuter vid 4 °C). Om så önskas kan procentandelen hematokrit fastställas efter centrifugeringen. Plasmadelen avlägsnas sedan från mikrohematokritröret och lagras i ett centrifugrör med 0,13 enheter aprotinin (en proteashämmare) vid – 80 °C tills bestämningen av VTG kan göras. Beroende på knölskallelöjans storlek (som är könsbestämd) uppgår mängden blod som kan samlas in till 5–60 mikroliter per fisk (Jensen m.fl., 2001).

Förfarande 1B: Knölskallelöja, insamling av blod från hjärtat

Alternativt kan blod också samlas in genom hjärtpunktering med en hepariniserad spruta (1 000 enheter heparin per ml). Blodet överförs till eppendorfrör (på is) och centrifugeras sedan (5 minuter, 7 000 g, rumstemperatur). Plasman bör överföras till rena eppendorfrör (i alikvoter om plasmavolymen är tillräckligt stor) och omedelbart frysas vid –80 °C tills den kan analyseras (Panter m.fl., 1998).

Förfarande 2A: Medaka, utskärning av levern

Avlägsna testfiskerna från testbehållaren

- (1) Testfisken bör avlägsnas ur testbehållaren med hjälp av en liten rund häv. Var noga med att inte tappa ner testfisken i de andra testbehållarna.
- (2) I princip ska testfiskarna avlägsnas i följande ordning: kontroll, lösningsmedelskontroll (i förekommande fall), lägsta koncentrationen, mittersta koncentrationen, högsta koncentrationen och positiv kontroll. Dessutom bör alla hanar avlägsnas från en testbehållare innan de återstående honorna avlägsnas.
- (3) Könet på varje testfisk fastställs på grundval av externa sekundära könskaraktärer (t.ex. formen på analfenan).
- (4) Placera testfisken i en behållare för transport och för den till arbetsstationen där levern skärs ut. Kontrollera att etiketterna på testbehållaren och transportbehållaren stämmer och bekräfta att det antal fiskar som har avlägsnats från testbehållaren och den antal fiskar som återstår i behållaren stämmer överens med vad som förväntas.
- (5) Om könet inte kan fastställas genom fiskens externa utseende avlägsnas alla fiskarna från testbehållaren. I detta fall bör könet identifieras genom granskning av könskörteln eller de sekundära könskaraktärerna under ett stereomikroskop.

Utskärning av levern

- (1) Överför testfisken från transportbehållaren till bedövningslösningen med den lilla runda häven.
- (2) Efter bedövning av testfisken överförs den till ett filterpapper (eller en pappersservett) med hjälp av en anatomisk pincett. När man lyfter upp testfisken bör man fatta tag med pincetten på sidorna av huvudet för att undvika att stjärten bryts av.
- (3) Torka av vattnet på ytan av testfisken på filterpappret (eller pappersservetten).

- (4) Lägg fisken med buksidan upp. Lägg därefter ett mindre tvärgående snitt halvvägs mellan den ventrala halsregionen och den mellersta abdominala regionen med hjälp av en dissektionssax.
- (5) För in dissektionssaxen i det lilla snittet och öppna buken från en punkt som är belägen kaudalt från gälmanteln till den kraniala sidan av anus längs bukens mittlinje. Var noga med att inte föra in dissektionssaxen för djupt så att levern och könskörteln skadas.
- (6) Utför följande steg under ett stereomikroskop.
- (7) Placera testfisken med buksidan upp på pappersservetten (en petriskål av glas eller ett objektglas går också bra).
- (8) Vik ut bukhålans väggar med en precisionspincett och blottlägg de inre organen. Det är även godtagbart att blottlägga de inre organen genom att vid behov avlägsna den ena sidan av bukhålans vägg.
- (9) Blotta den del som förbinder levern med gallblåsan med hjälp av en annan precisionspincett. Tag därefter fatt i gallgången och skär av gallblåsan. Var noga med att inte skada gallblåsan.
- (10) Tag fatt i matstrupen och skär loss mag-tarmkanalen från levern på samma sätt. Var försiktig så att inte tarminnehållet läcker ut. Skär loss den kaudala mag-tarmkanalen från anus och avlägsna den från bukhålan.
- (11) Skär bort fettmassan och andra vävnader från leverns utsida. Var noga med att inte skada levern.
- (12) Tag fatt i portasystemet med hjälp av en precisionspincett och avlägsna levern från bukhålan.
- (13) Placera levern på objektglaset. Avlägsna om så behövs allt övrigt fett och all främmande vävnad (t.ex. bukhinna) från leverns yta med hjälp av precisionspincetten.
- (14) Väg levern med ett 1,5 ml mikrorör som emballagevikt med en elektronisk analysvåg. Registrera värdet i en tabell (avläs: 0,1 mg). Bekräfta identifieringsinformationen på mikroröret som innehåller levern.
- (15) Stäng mikrorörets lock. Förvara det i ett kylställ (eller ett isställ).
- (16) När levern har avlägsnats diskas dissektionsinstrumenten eller ersätts med rena.
- (17) Avlägsna leverna från alla fiskar i transportbehållaren enligt beskrivning ovan.
- (18) När leverna har skurits ut från alla fiskarna i transportbehållaren (dvs. alla hanar och honor i en testbehållare) placeras alla leverprover i ett provrörsställ med en etikett för identifiering och förvaras i en frys. När leverna förs vidare till förbehandlingen strax efter utskärningen bärs proverna till nästa arbetsstation i ett kylställ (eller isställ).

Efter utskärningen av levern kan en histologisk undersökning av könskörtlarna göras på fiskroppen och sekundära könskaraktärer mätas.

Prov

Lagra leverproverna från testfiskarna vid $\leq -70\text{ °C}$ om de inte ska användas i förbehandlingen kort efter utskärningen.

Fig-1

Ett snitt läggs precis framför bröstfenorna med en sax.

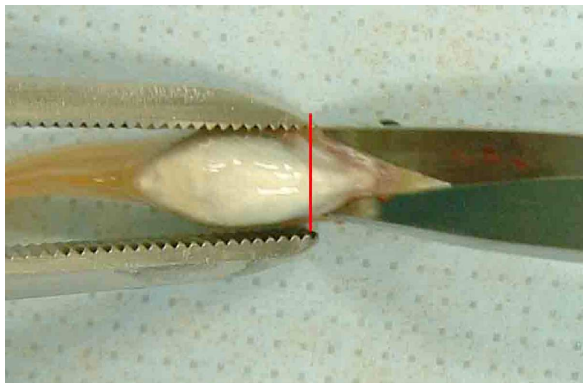


Fig-2

Buken öppnas längs mittlinjen med en sax till en punkt ungefär 2 mm kranialt från anus.

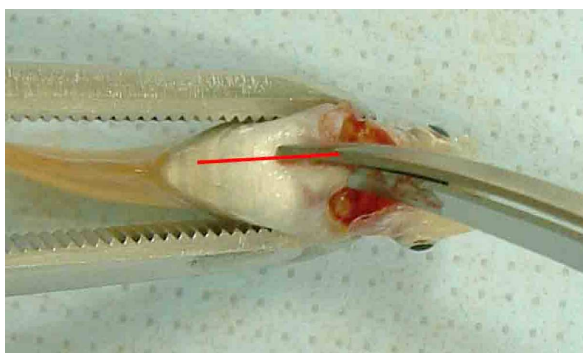


Fig-3

Bukväggarna öppnas med en pincett för blottläggning av levern och andra interna organ.

(Alternativt kan bukväggarna fästas lateralt).

Pilen visar levern.

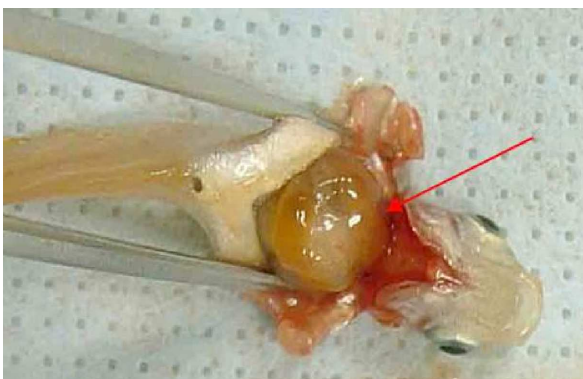


Fig-4

Levern friläggs och avlägsnas utan att skära med hjälp av en peang.

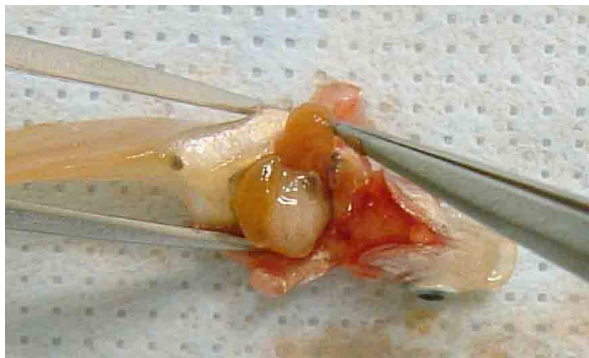


Fig-5

Tarmarna dras försiktigt ut med hjälp av peangen.

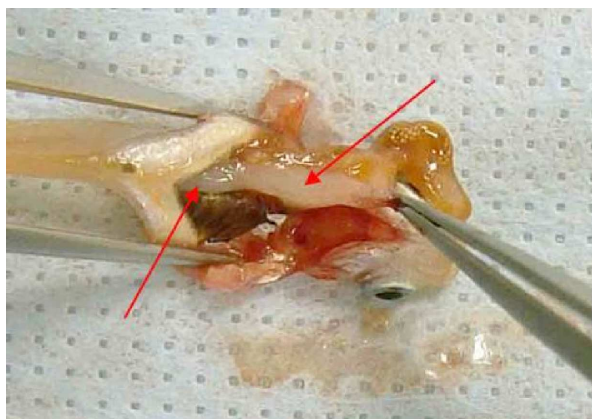


Fig-6

Båda ändarna av tarmarna och eventuellt vidhängande tarmkäck klipps av med en sax.

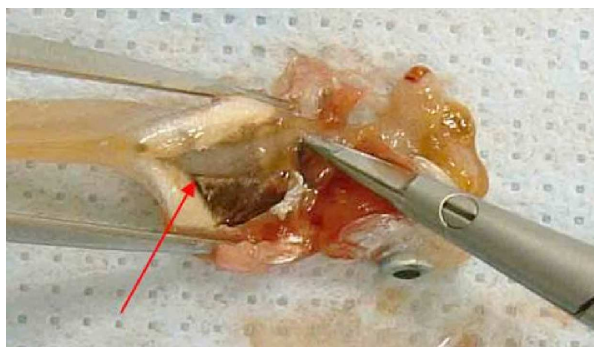


Fig-7 (hona)

Förfarandet är exakt detsamma för honor.

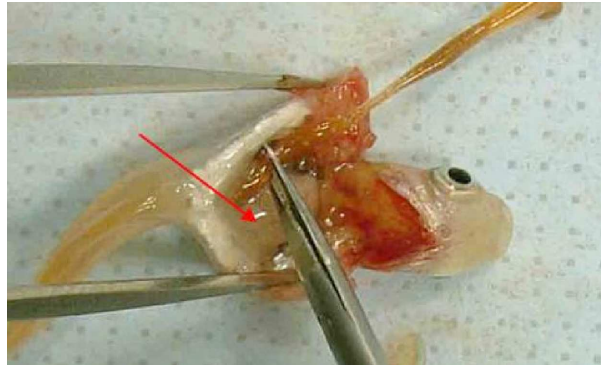


Fig-8

Det avslutade förfarandet.



Förfarande 2B: Medaka (*Oryzias latipes*), förbehandling av levern för vitellogeninanalys

Ta fram flaskan med homogenatbuffert från ELISA-utrustningen och kyl den med krossad is (lösningens temperatur: $\leq 4^{\circ}\text{C}$). Om man använder homogenatbuffert från EnBio:s ELISA-system ska lösningen tinas vid rumstemperatur. Kyl sedan ner flaskan med krossad is.

Beräkna volymen av homogenatbuffert för levern på grundval av dess vikt (tillsätt 50 μl av homogenatbuffert per mg av levervikten). Om levern till exempel väger 4,5 mg är homogenatbuffertens volym för levern 225 μl . Gör upp en förteckning över homogenatbuffertens volym för alla leverarna.

Förberedelse av levern för förbehandling

- (1) Ta ut det 1,5 ml mikrorör som innehåller levern ur frysen strax före förbehandlingen.
- (2) Förbehandlingen av levern från hanar bör genomföras före förbehandlingen av honornas levern för att undvika kontaminering av vitellogenin. Förbehandlingen för testgrupperna bör dessutom utföras i följande ordning: kontroll, lösningsmedelskontroll (i förekommande fall), lägsta koncentrationen, mittersta koncentrationen, högsta koncentrationen och positiv kontroll.

- (3) Antalet 1,5 ml mikrorör som innehåller leverprover som tagits ut ur frysen vid en viss tidpunkt bör inte överstiga det antal som kan centrifugeras vid den tidpunkten.
- (4) Ordna 1,5 ml mikrorören som innehåller leverprover efter de nummer proven har i isstället (levern behöver inte tinas).

Utförandet av förbehandlingen

1) Tillsats av homogenatbuffert

Kontrollera på förteckningen vilken volym av homogenatbuffert som ska användas för ett visst leverprov och ställ in mikropipetten (volymintervall: 100–1 000 µl) på den lämpliga volymen. Fäst en ren spets på mikropipetten.

Pipettera upp homogenatbuffert från reagensflaskan och tillsätt 1,5 ml buffert i det 1,5 ml mikrorör som innehåller levern.

Tillsätt homogenatbuffert i alla 1,5 ml mikrorör som innehåller leverar enligt det förfarande som beskrivs ovan. Det finns ingen anledning att byta ut mikropipettspetsen med en ny. Om spetsen har blivit kontaminerad eller misstänks vara kontaminerad bör den dock bytas ut.

2) Homogenisering av levern

- Fäst en ny mortelstöt för homogenisering på mikrorörshomogenisatorn.
- För in mortelstöten i 1,5 ml mikroröret. Håll mikrorörshomogenisatorn och pressa levern mellan mortelstöten yta och innerväggen på 1,5 ml mikroröret.
- Kör mikrorörshomogenisatorn i 10–20 sekunder. Kyl ner 1,5 ml mikroröret med krossad is när detta görs.
- Ta ut mortelstöten från 1,5 ml mikroröret och låt det stå i ca 10 sekunder. Kontrollera därefter suspensionen visuellt.
- Om man kan se delar av lever i suspensionen ska steg (3) och (4) upprepas tills ett godtagbart leverhomogenat har beretts.
- Kyl ner det suspenderade leverhomogenatet i isstället till dess att centrifugeringen utförs.
- Byt ut mortelstöten mot en ny för varje homogenat.
- Homogenisera alla leverar med homogenatbuffert enligt det förfarande som beskrivs ovan.

3) Centrifugering av det suspenderade leverhomogenatet

- Bekräfta att temperaturen i kylcentrifugkammaren är $\leq 5^{\circ}\text{C}$.
- Ställ in 1,5 ml mikrorören som innehåller de suspenderade leverhomogenaten i kylcentrifugen (justera jämvikten vid behov).
- Centrifugera de suspenderade leverhomogenaten vid 13 000 g i 10 minuter vid $\leq 5^{\circ}\text{C}$. Om supernatanterna är tillräckligt separerade kan dock centrifugalkraften och varaktigheten justeras efter behov.
- Efter centrifugeringen kontrolleras att supernatanterna är tillräckligt separerade (yta: fett, mellanparti: supernatant, bottenstikt: levervävnad). Om skikten inte är tillräckligt separerade centrifugeras suspensionen igen under samma betingelser.
- Avlägsna alla prov från kylcentrifugen och ordna dem efter de nummer proven har i isstället. Var noga med att inte återsuspendera de åtskilda skikten efter centrifugeringen.

4) Insamling av supernatanten

- Placera fyra 0,5 ml mikrorör i provrörsstället för lagring av supernatanten.
- Samla in 30 µl supernatant (separerad som det mellanliggande skiktet) med mikropipetten och tillsätt supernatanten till ett 0,5 ml mikrorör. Var noga med att inte få med fett på ytan eller levervävnaden i det undre lagret.
- Samla in supernatanten och tillsätt den till två andra 0,5 ml mikrorör på samma sätt som beskrivs ovan.
- Samla in resten av supernatanten med mikropipetten (om möjligt: ≥ 100 µl). Tillsätt därefter supernatanten till de återstående 0,5 ml mikrorören. Var noga med att inte få med fett på ytan eller levervävnaden i det undre lagret.
- Stäng locket på 0,5 ml mikroröret och anteckna supernatantens volym på etiketten. Kyl därefter omedelbart ner mikrorören i isstället.
- Byt ut spetsen på mikropipetten till en ny för varje supernatant. Om en stor mängd fett fäster sig vid spetsen bör den omedelbart bytas ut med en ny för att undvika kontaminering av leverextraktet med fett.
- Fördela hela den centrifugerade supernatanten i 0,5 ml mikrorör enligt det förfarande som beskrivs ovan.
- Efter att supernatanten har tillsatts till 0,5 ml mikrorör placeras de alla i provrörsstället med identifieringsetiketten och fryses sedan omedelbart ner i frysen. Om VTG-halterna ska mätas omedelbart efter förbehandlingen hålls ett 0,5 ml mikrorör (med 30 µl supernatant) kallt i provrörsstället och överförs sedan till arbetsstationen där ELISA-testet utförs. I ett sådant fall ska alla övriga mikrorör placeras i provrörsställena och frysas ner i frysen.
- Efter insamling av supernatanten kasseras restprodukterna på lämpligt sätt.

Lagring av provet

Lagra 0,5 ml mikrorören som innehåller supernatanten av leverhomogenatet vid ≤ -70 °C tills de används för ELISA-testet.

Förfarande 3A: Sebrafisk, insamling av blod från den kaudala venen/artären

Omedelbart efter bedövning skärs stjärtspolen av transversalt, och blodet insamlas från den kaudala artären/venen med ett hepariniserat mikrohematokrit-centrifugerat kapillärrör. Volymerna blod varierar mellan 5 och 15 mikroliter beroende på fiskens storlek. En lika stor mängd buffertlösning med aprotinin (6 mikrogram i fosfatbuffrad saltlösning (PBS)) tillsätts i mikrokapillärröret och plasman separeras från blodet genom centrifugering (5 minuter vid 600 g). Plasman samlas i provrören och lagras vid -20 °C tills de analyseras med avseende på VTG eller andra proteiner av intresse.

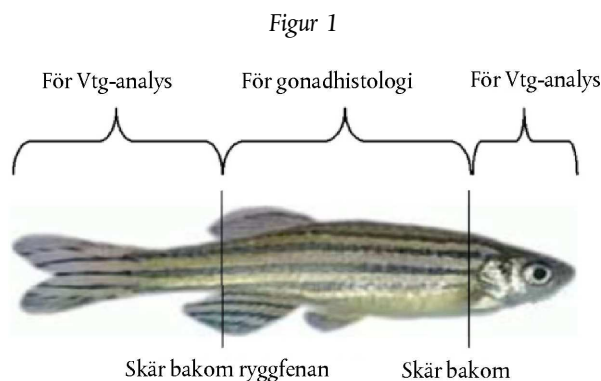
Förfarande 3B: Sebrafisk, insamling av blod genom hjärtpunktering

För att undvika koagulering av blod och nedbrytning av proteiner tas proven i en buffertlösning bestående av fosfatbuffrad saltlösning (PBS) som innehåller heparin (1 000 enheter/ml) och proteashämmaren aprotinin (2 TIU/ml). Som ingredienser i buffertlösningen rekommenderas heparin, ammoniumsalt och frystorkad aprotinin. För blodprovstagning rekommenderas en spruta (1 ml) med en fast tunn nål (t.ex. Braun omnikan-F). Sprutan ska fyllas på förhand med en buffert (ca 100 mikroliter) för att helt eluera de små blodvolymerna från varje fisk. Blodproven tas genom hjärtpunktering. Till att börja med bör fisken bedövas med MS-222 (100 mg/l). En lämplig bedövningsnivå gör det möjligt för användaren att urskilja sebrafiskens hjärtslag. Medan hjärtpunkteringen utförs ska sprutans kolv hållas under svagt tryck. Samla in blodvolymerna på mellan 20 och 40 µl. Efter hjärtpunkteringen ska blod/buffertblandningen tillsättas i provröret. Plasman separeras från blodet genom centrifugering (20 min., 5 000 g) och bör förvaras vid -80 °C tills den behövs för analys.

Förfarande 3C: Standardförfarande: Sebrafisk, homogenisering av huvud och stjärt

1. Fiskarna bedövas eller avlivas i enlighet med testbeskrivningen.
2. Huvudet och stjärten skärs av i enlighet med figur 1.

Obs: Alla dissektionsinstrument och skärbrädan bör sköljas och rengöras ordentligt (t.ex. med 96 % etanol) mellan hanteringen av varje enskild fisk för att förhindra "vitellogenin-förorening" från honor eller inducerade hanar till oinducerade hanar.



3. Den sammanlagda vikten av huvud och stjärt från varje fisk mäts till närmaste mg.
4. Efter vägning placeras delarna i lämpliga rör (t.ex. 1,5 ml eppendorfrör) och fryses vid -80°C tills homogeniseringen, eller homogeniseras direkt på is med två mortelstötare av plast. (Andra metoder kan användas om de utförs på is och resultatet är en homogen massa). Obs: Rören ska numreras noggrant så att fiskarnas huvud och stjärt kan hänföras till deras respektive kroppar, som används för histologisk undersökning av könskörtlarna.
5. När en homogen massa erhållits tillsätts iskall **homogeniseringsbuffertlösning** (*) med en mängd på 4 gånger vävnadens vikt. Fortsätt att arbeta med mortelstötarna tills blandningen är homogen. Obs: Nya mortelstötare används för varje fisk.
6. Proven läggs på is tills centrifugeringen vid 4°C och 50 000 g i 30 minuter.
7. Använd en pipett för att dosera ut portioner på 20 μl supernatant i **minst** två rör genom att doppa pipettens spets under fettlagret på ytan och försiktigt suga upp supernatanten utan att få med fragment av fett eller små bitar.
8. Rören förvaras vid -80°C fram till användningen.

(*) Buffertlösning för homogenisering

— 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 % proteashämmarblandning (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 μl proteashämmarblandning.
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), t.ex. från Bie & Berntsen, Danmark.
— Proteashämmarblandning: Från Sigma (för däggdjursvävnader), produkt nr P 8340.

Anmärkning: Buffertlösningen för homogenisering bör användas samma dag som den beretts. Lagg den på is under användningen.

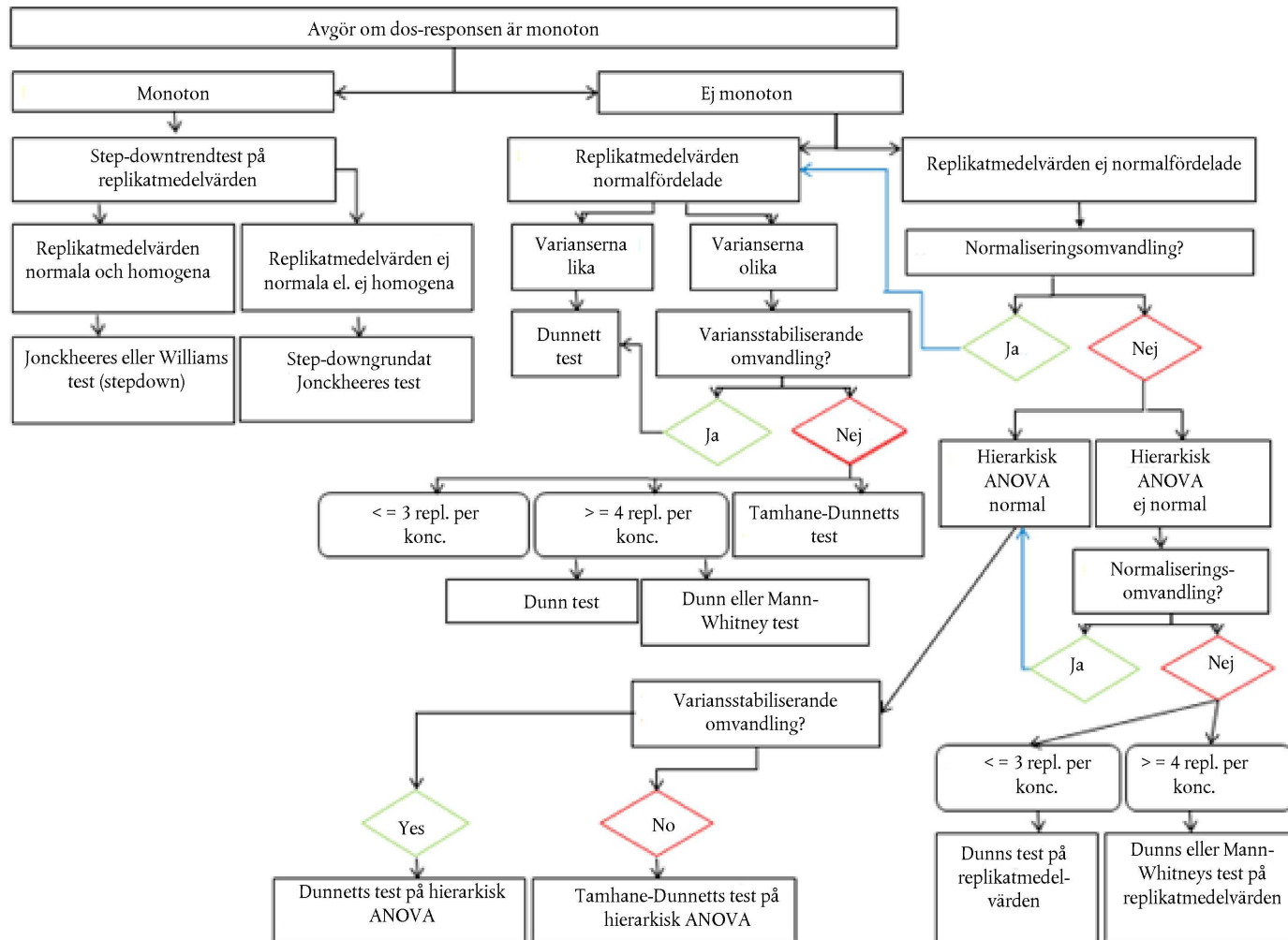
*Tillägg 7***VITELLOGENINBERIKNINGSPROVER OCH REFERENSSTANDARD FÖR TESTER MELLAN LABORATORIER**

Varje dag som VTG-tester utförs ska ett berikningsprov analyseras som beretts med en referensstandard för tester mellan laboratorier. VTG som används för beredning av referensstandard för tester mellan laboratorier ska komma från en annan sats än den som används för att bereda kalibreringsstandarderna för det test som utförs.

Ett berikningsprov bereds genom att man tillsätter en känd mängd av referensstandard för tester mellan laboratorier till ett prov med plasma från kontrollhanar. Provet berikas tills en VTG-koncentration på mellan 10 och 100 gånger den förväntade vitellogeninkoncentrationen i hanliga kontrollfiskar uppnås. Det berikade provet med hanlig kontrollplasma kan komma från en enda fisk eller vara en blandning av flera olika fiskar.

Ett delprov av den oberikade hanliga kontrollplasman analyseras i minst två duplikatbrunnar. Det berikade provet analyseras också i minst två duplikatbrunnar. Den genomsnittliga mängden vitellogenin i de två icke-berikade hanliga kontrollproven läggs till den beräknade mängden VTG som lagts till berikningsproverna i syfte att fastställa en förväntad koncentration. Förhållandet mellan denna förväntade koncentration och den uppmätta koncentrationen rapporteras tillsammans med resultaten från varje försöksomgång som utförs på samma dag.

FLÖDESSCHEMA ÖVER BESLUTSGÅNGEN FÖR DEN STATISTISKA ANALYSEN



C.49 Akut toxicitetstest på fiskembryo (FET)

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 236 (2013). Här beskrivs ett FET-test med sebrafisk (*Danio rerio*). Detta test är utformat för att bestämma kemikaliers akuta toxicitet under fiskars embryonala utveckling. FET-testet är baserat på studier och valideringar av sebrafisk (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14). FET-testet har framgångsrikt tillämpats på ett brett spektrum kemikalier med olika verkningsätt, löslighet, volatilitet och hydrofobicitet (översikt ges i 15 och 16).
2. De definitioner som används i denna testmetod finns i tillägg 1.

TESTPRINCIP

3. Nyligen befruktade sebrafiskägg exponeras för testkemikalien under en 96-timmarsperiod. Var 24:e timme registreras upp till fyra apikala observationer som indikatorer för dödlighet (6): i) koagulering av befruktade ägg, ii) avsaknad av somitbildning, iii) svansknoppen avlossas inte från gulesäcken och (iv) avsaknad av hjärtslag. I slutet av exponeringstiden bestäms akut toxicitet baserat på ett positivt resultat i någon av de fyra apikala observationerna och LC_{50} beräknas.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

4. Användbar information om ämnesspecifika egenskaper innefattar strukturformel, molekylvikt, renhet, stabilitet i vatten och ljus, pK_a och K_{ow} , vattenlöslighet och ångtryck samt resultat av ett test avseende biologisk löslighetsbrytbarhet (TM C.4 (17) eller TM C.29 (18)). Löslighet och ångtryck kan användas för att beräkna Henrys konstant, som anger eventuell förlust på grund av avdunstning av testkemikalien. Man bör ha tillgång till en tillförlitlig analysmetod för kvantifiering av ämnet i testlösningen. Metoden bör ha känd och rapporterad noggrannhet och detektionsgräns.
5. Om testmetoden används för att testa en blandning ska dess sammansättning karakteriseras så långt detta är möjligt, t.ex. beståndsdelarnas kemiska identitet, deras kvantitativa förekomster och deras ämnesspecifika egenskaper (se punkt 4). Innan testmetoden för lagstadgad testning av en blandning används bör man överväga om den kommer att ge godtagbara resultat för det avsedda föreskrivna syftet.
6. När det gäller ämnen som kan aktiveras via metabolism, finns det bevis för att sebrafiskembryon har biotransformationskapacitet (19) (20) (21) (22). Fiskembryons ämnesomsättning liknar dock inte alltid unga eller vuxna fiskars ämnesomsättning. Det protoxiska ämnet allylalkohol (9) har t.ex. utelämnats i FET-testet. Om det finns indikationer på att metaboliter eller andra omvandlingsprodukter av betydelse kan vara giftigare än huvudföreningen bör testet även utföras med dessa metaboliter/omvandlingsprodukter och dessa resultat bör även beaktas i slutsatserna om testkemikaliens toxicitet. Alternativt kan ett annat test utföras där ämnesomsättningen beaktas ytterligare.
7. Embryon förväntas inte vara känsliga för ämnen med en molekylvikt på ≥ 3 kDa, en mycket komplex och voluminös molekylstruktur, och ämnen som orsakar fördröjd kläckning och kan hindra eller minska exponeringen efter kläckning. Detta beror på ämnets begränsade biotillgänglighet och därför kan andra toxicitetstester vara lämpligare.

TESTETS GILTIGHET

8. För att testresultaten ska vara giltiga måste följande kriterier vara uppfyllda:
 - a) Den totala befruktningsgraden för alla ägg som samlats in bör vara ≥ 70 % i det testade partiet.

- b) Vattentemperaturen bör hållas vid 26 ± 1 °C i testkärnen under testet.
- c) Det totala antalet överlevande embryon i den negativa kontrollen (utspädningsvatten) och, i förekommande fall, i lösningsmedelskontrollen bör vara ≥ 90 % fram till slutet av 96-timmarsexponeringen.
- d) Exponering för den positiva kontrollen (t.ex. 4,0 mg/l 3,4-dikloranilin för sebrafisk) bör leda till en minimal dödlighet på 30 % i slutet av 96-timmarsexponeringen.
- e) Kläckningsgraden i den negativa kontrollen (i förekommande fall även i lösningsmedelskontrollen) bör vara ≥ 80 % i slutet av 96-timmarsexponeringen.
- f) I slutet av 96-timmarsexponeringen bör koncentrationen av upplöst syre i den negativa kontrollen och den högsta testkoncentrationen vara ≥ 80 % av luftmättnadsvärdet.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

9. En översikt över rekommenderade underhålls- och testförhållanden ges i tillägg 2.

Utrustning

10. Följande utrustning behövs:

- a) Fisktankar tillverkade av kemiskt inert material (t.ex. glas) och tillräckligt stora för den rekommenderade fisktätheten (se "Hållande av avelsfisk", punkt 14).
- b) Inverterat mikroskop och/eller stereolupp med en kapacitet på minst 80 gångers förstoring. Om det rum som används för att registrera observationer inte kan justeras till 26 ± 1 °C krävs en temperaturkontrollerad "Cross Movement Stage" eller andra metoder för att upprätthålla temperaturen.
- c) Testkärn, t.ex. standard 24-hålsplattor med ett djup på cirka 20 mm. (Se "Testkärn", punkt 11),
- d) Exempelvis självhäftande folie för att täcka 24-hålsplattorna.
- e) Inkubator eller luftkonditionerat rum med kontrollerad temperatur, som gör det möjligt att hålla 26 ± 1 °C i hålen (eller testkärnen).
- f) pH-mätare.
- g) Syremätare.
- h) Utrustning för bestämning av vattnets hårdhetsgrad och ledningsförmåga.
- i) Lekfälla: instrumentbrickor av glas, rostfritt stål eller andra inerta material, trådnät (nätstorlek $2 \pm 0,5$ mm) av rostfritt stål eller annat inert material för att skydda äggen när de väl lagts, leksubstrat (t.ex. konstgjorda växter av inert material) (TM C.48 tillägg 4a (23)).
- j) Pipetter med vidgade öppningar för att samla in äggen.
- k) Glaskärn för beredning av olika testkoncentrationer och utspädningsvatten (bägare, mätkolvar, mätglas och graderade pipetter) eller för att samla in sebrafiskägg (t.ex. bägare, kristalliseringsfat).
- l) Om alternativa exponeringssystem, t.ex. genomflöde (24) eller passiv dosering (25), används för utförandet av testet behövs lämplig lokal och utrustning.

Testbehållare

11. Testbehållare av glas eller polystyren bör användas (t.ex. 24-hålsplattor med en fyllningskapacitet på 2,5–5 ml per håll). Vid misstanke om adsorption till polystyren (t.ex. för opolära plana ämnen med hög K_{ow}) bör inert material (glas) användas för att minska adsorptionsförluster (26). Testbehållarna bör placeras slumpvis i inkubatorn.

Vatten och testförhållanden

12. Utspädning av underhållsvattnet rekommenderas för att uppnå hårdhetsnivåer som är typiska för många olika ytvatten. Utspänningsvattnet bör beredas från rekonstituerat vatten (27). Den resulterande hårdhetsgraden bör motsvara 100–300 mg/l CaCO_3 för att förhindra överdriven utfällning av kalciumkarbonat. Annat vätkaraktäriserat yt- eller brunnsvatten kan användas. Det rekonstituerade vattnet kan anpassas till underhållsvatten med låg hårdhetsgrad genom utspädning med avjonat vatten upp till ett förhållande på 1:5 till en lägsta hårdhetsgrad på 30–35 mg/l CaCO_3 . Vattnet luftas till syremättad innan testkemikalien tillsätts. Temperaturen bör hållas vid 26 ± 1 °C i brunnarna under hela testet. pH-värdet bör ligga inom ett intervall på 6,5–8,5 och inte variera med mer än 1,5 enheter inom detta intervall under testet. Om pH inte förväntas hålla sig inom intervallet bör en pH-justering göras innan testet inleds. pH-justeringen bör göras på ett sådant sätt att stamlösningens koncentration inte ändras i någon betydande utsträckning och ingen kemisk reaktion eller utfällning av testkemikalien uppstår. Användning av väteklorid (HCl) och natriumhydroxid (NaOH) för att korrigera pH-värdet i lösningarna med testkemikalien rekommenderas.

Testlösningar

13. Testlösningar av de valda koncentrationerna kan beredas t ex. genom spädning av en stamlösning. Stamlösningen bör helst beredas genom att man helt enkelt blandar eller skakar testkemikalien i utspänningsvattnet på mekanisk väg (t.ex. omrörning och/eller ultraljud). Om testkemikalien är svårslöslig i vatten bör man följa de förfaranden som beskrivs i OECD:s vägledningsdokument nr 23 om hantering av svåra ämnen och blandningar (28). Man bör undvika att använda lösningsmedel, men det kan i vissa fall krävas för att framställa en stamlösning med lämplig koncentration. Om ett lösningsmedel används som hjälpmedel i beredningen av stamlösningen bör dess slutliga koncentration inte överskrida 100 µl/l och vara densamma i alla testkärl. När lösningsmedel används krävs en extra lösningsmedelskontroll.

Hållande av avelsfisk

14. Ett avelsbestånd av oexponerad sebrafisk av vildtyp med väldokumenterad fertilitetsgrad används för äggproduktion. Fisken bör vara fri från makroskopiskt urskiljbara symtom på infektion och sjukdom och bör inte ha genomgått läkemedelsbehandling (akut eller profylaktisk) under två månader innan lek. Avelsfisken hålls i akvarier med en rekommenderad fisktäthet på 1 liter vatten per fisk och en fast ljusperiod på 12–16 timmar (29) (30) (31) (32) (33). Filtreringsgraden bör justeras så att den blir optimal och en överdrivet hög filtreringsgrad som orsakar kraftiga störningar i vattnet bör undvikas. Se tillägg 2 för utfodringsförhållanden. Överskottsfoder bör undvikas och man bör regelbundet kontrollera vattenkvaliteten och att akvarierna är rena. Vattnet bör återställas till sitt ursprungliga tillstånd vid behov.

Kvalifikationsprövning

15. Som referenskemikalie bör 3,4-dikloranilin (används i valideringsstudierna (1)(2)) testas i en fullständig koncentrationsrespons för att kontrollera känsligheten hos den fiskstam som används, företrädesvis två gånger per år. Alla laboratorier som tar denna testmetod i bruk för första gången bör använda referenskemikalien. Ett laboratorium kan använda denna kemikalie för att visa sin tekniska kompetens att genomföra analysen innan de lämnar in data för det föreskrivna syftet.

Äggproduktion

16. Sebrafiskägg kan produceras via lekgrupper (i individuella lektankar) eller via "masslek" (i underhållstankarna). När det gäller lekgrupper bör hanar och honor (t.ex. i ett förhållande på 2:1) i en avelsgrupp placeras i lektankar några timmar innan mörkerperioden inleds dagen före testet. Eftersom leken ibland uteblir i lekgrupper av sebrafisk rekommenderas parallell användning av minst tre lektankar. För att undvika systematiska genetiska avvikelser samlas ägg in från minst tre avelsgrupper, blandas och väljs ut slumpvis.
17. För insamling av äggen placeras lekfallor i lek- eller underhållstankarna innan mörkerperioden inleds dagen före testet eller innan ljusperioden inleds på dagen för testet. För att undvika predation av ägg av vuxen sebrafisk täcks lekfallorna med inert trådnät av lämplig maskstorlek (cirka $2 \pm 0,5$ mm). Om det anses nödvändigt kan konstgjorda växter tillverkade av inert material (t.ex. plast eller glas) fästas vid nätet som lekstimulus (3)(4)(5)(23)(35). Vittrat plastmaterial som inte läcker (t.ex. ftalater) bör användas. Parning, lek och befruktning sker inom 30 minuter efter gryningen och lekfallorna med de insamlade äggen kan då försiktigt avlägsnas. Sköljning av äggen med rekonstituerat vatten efter insamling från lekfallorna rekommenderas.

Differentiering av äggen

18. De befruktade äggen genomgår den första klyvningen vid 26 °C efter cirka 15 minuter och de påföljande samtidiga klyvningarna bildar 4, 8, 16 och 32 cellblastomerer (se tillägg 3)(35). Under dessa stadier kan de befruktade äggen tydligt identifieras genom utvecklingen av en blastula.

FÖRFARANDE

Exponeringsförhållanden

19. Tjugo embryon per koncentration (ett embryo per håll) utsätts för testkemikalien. Exponeringen bör vara sådan att ± 20 % av den nominella kemiska koncentrationen bibehålls under hela provningen. Om detta inte är möjligt i ett statistiskt system bör ett hanterbart halvstatistiskt förnyelseintervall tillämpas (t.ex. förnyelse var 24:e timme). I dessa fall måste exponeringskoncentrationerna minst kontrolleras i de högsta och lägsta testkoncentrationerna i början och slutet av varje exponeringsintervall (se punkt 36). Om en exponeringskoncentration på ± 20 % av de nominella koncentrationerna inte kan upprätthållas måste alla koncentrationer mätas i början och slutet av varje exponeringsintervall (se punkt 36). Vid förnyelse är det viktigt att se till att embryona täcks av en liten mängd av den gamla testlösningen så att de inte torkar ut. Testet kan anpassas för att uppfylla testkraven för specifika ämnen (t.ex. genomflöde (24), passiva doseringssystem (25) för enkelt nedbrytbara eller starkt adsorberande ämnen (29) eller andra för flyktiga ämnen (36) (37)). Det är viktigt att undvika eventuell stress för embryona. Testkärnen bör konditioneras med provlösningarna under minst 24 timmar innan testet inleds. Testförhållandena sammanfattas i tillägg 2.

Testkoncentrationer

20. I regel krävs minst fem koncentrationer av testkemikalien med ett fast koncentrationsförhållande som inte överstiger 2,2 för att uppfylla de statistiska kraven. Om färre än fem koncentrationer används måste detta motiveras. Den högsta testkoncentrationen ska helst ge 100-procentig dödlighet, och den lägsta testkoncentrationen ska helst inte ge någon observerbar effekt alls enligt punkt 28. Före det slutliga testet kan ett preliminärt test göras för att fastställa lämpligt koncentrationsintervall. Det preliminära testet görs vanligtvis med tio embryon per koncentration. Anvisningarna nedan avser ett test med 24-hålsplattor. Om olika testkärn (t.ex. små petriskålar) används eller fler koncentrationer testas måste anvisningarna anpassas därefter.

21. Detaljer och visuella instruktioner för fördelningen av koncentrationer mellan 24-hålsplattorna återfinns i punkt 27 och bilaga 4, figur 1.

Kontroller

22. Kontroller med utspädningsvatten krävs både som negativ kontroll och som intern kontroll av plattorna. Om fler än ett dött embryo observeras i den interna kontrollen av plattorna förkastas plattan, vilket minskar antalet koncentrationer som används för att härleda LC_{50} . Om en hel platta förkastas kan det bli svårare att utvärdera och särskilja observerade effekter, särskilt om den förkastade plattan är en platta för lösningsmedelskontroll eller en platta som innehåller behandlade embryon. I det första fallet måste testet upprepas. I det andra fallet förloras en eller flera hela behandlingsgrupper på grund av dödligheten i den interna kontrollen, vilket i sin tur kan påverka möjligheterna att utvärdera effekter och bestämma LC_{50} värden.
23. En positiv kontroll vid en fast koncentration på 4 mg/l 3,4-dikloranilin utförs med varje äggsats som används för testningen.
24. Om lösningsmedel används exponeras en ytterligare grupp på 20 embryon för lösningsmedlet i en separat 24-hålsplatta, vilken tjänar som lösningsmedelskontroll. För att testet ska anses acceptabelt bör det påvisas att lösningsmedlet inte har några signifikanta effekter på kläckningstid eller överlevnad, och inte heller framkallar några andra negativa effekter på embryona (jfr punkt 8c).

Inledning av exponering och testets varaktighet

25. Testet inleds så snart som möjligt efter det att äggen befruktats och avslutas efter 96 timmars exponering. Embryona bör nedsänkas i testlösningarna innan klyvningen av blastodisken inleds eller senast vid det 16:e cellstadiet. För att exponeringen ska kunna inledas med minsta möjliga försening väljer man slumpvis ut minst dubbelt så många ägg som behövs per behandlingsgrupp. Äggen överförs till de respektive koncentrationerna och kontrollerna (t.ex. i 100 ml kristalliseringsfat, äggen bör vara helt täckta) senast 90 minuter efter befruktning.
26. Livskraftiga befruktade ägg bör skiljas från obefruktade ägg och överföras till 24-hålsplattor som har förkonditionerats i 24 timmar och återfyllts med nyberedda testlösningar, 2 ml/hål, inom 180 minuter efter befruktning. Med hjälp av stereomikroskop (helst ≥ 30 gångers förstoring) väljer man sedan ut befruktade ägg som genomgår klyvning och inte uppvisar några uppenbara oregelbundenheter under klyvning (asymmetri, vesikelbildning) eller skador på den yttre fosterhinnan. För insamling av ägg och separation, se tillägg 3, figurerna 1 och 3, och tillägg 4, figur 2.

Fördelning av ägg mellan 24-hålsplattorna

27. Äggen fördelas mellan plattornas hål i följande antal (se även tillägg 4, figur 1):
- 20 ägg på en platta för varje testkoncentration.
 - 20 ägg som lösningsmedelskontroll på en platta (om nödvändigt).
 - 20 ägg som positiv kontroll på en platta.
 - 4 ägg i utspädningsvatten som intern kontroll av plattan på var och en av ovanstående plattor.
 - 24 ägg i utspädningsvatten som negativ kontroll på en platta.

Observationer

28. De apikala observationer som utförs av varje testat embryo omfattar följande: embryonas koagulering, avsaknad av somitbildning, ej lossad svans och avsaknad av hjärtslag (tabell 1). Dessa observationer används för att bestämma dödligheten enligt följande: Ett positivt resultat i en av observationerna innebär att sebrafiskembryot är dött. Dessutom registreras kläckning i behandlings- och kontrollgrupperna dagligen, med början efter 48 timmar. Observationerna registreras var 24:e timme fram till slutet av testet.

Tabell 1

Apikala observationer av akut toxicitet hos sebrafiskembryon 24–96 timmar efter befruktning.

	Exponeringstider			
	24 tim	48 tim	72 tim	96 tim
Koagulerade embryon	+	+	+	+
Avsaknad av somitbildning	+	+	+	+
Ej lossad svans	+	+	+	+
Avsaknad av hjärtslag		+	+	+

29. *Koagulering av embryot*: Koagulerade embryon är mjölkvita och ser mörka ut i mikroskopet (se tillägg 5, figur 1). Antalet koagulerade embryon bestäms efter 24, 48, 72 och 96 timmar.
30. *Avsaknad av somitbildning*: Vid 26 ± 1 °C har cirka 20 somiter bildats efter 24 timmar (se tillägg 5, figur 2) hos ett sebrafiskembryo med normal utveckling. Ett normalt utvecklat embryo visar spontana rörelser (sammandragningar från sida till sida). Spontana rörelser visar att somiter bildas. Avsaknad av somiter registreras efter 24, 48, 72 och 96 timmar. Avsaknad av somitbildning efter 24 timmar kan bero på en allmän försening i utvecklingen. Somiter bör bildas senast efter 48 timmar. Om så inte sker anses embryona vara döda.
31. *Ej lossad svans*: Hos ett normalt utvecklat sebrafiskembryo observeras avlossning av svansen (se tillägg 5, figur 3) från äggulan efter bakre töjning av embryokroppen. Ej lossad svans registreras efter 24, 48, 72 och 96 timmar.
32. *Avsaknad av hjärtslag*: Hos normalt utvecklade sebrafiskembryon vid 26 ± 1 °C syns hjärtslagen efter 48 timmar (se tillägg 5, figur 4). Särskild försiktighet bör iaktas vid registreringen av denna endpoint eftersom oregelbundna (onormala) hjärtslag *inte* bör registreras som en dödlig effekt. Synliga hjärtslag utan cirkulation i aorta abdominalis anses inte vara dödligt. För att registrera denna endpoint bör embryon som inte uppvisar hjärtslag observeras med minst 80x förstoring i minst en minut. Avsaknad av hjärtslag registreras efter 48, 72 och 96 timmar.
33. Kläckningsgraden för alla behandlings- och kontrollgrupper bör registreras från 48 timmar och framåt och rapporteras. Även om kläckning inte är en endpoint som används för beräkning av LC_{50} säkerställer kläckningen att embryot exponeras utan att eventuellt hindras av den yttre fosterhinnan, och kan därför vara till hjälp i tolkningen av data.
34. Detaljerade beskrivningar av normal utveckling (35) och exempel på onormal utveckling av sebrafiskembryon ges i tilläggen 3 och 5.

Analysmätningar

35. I början och i slutet av testet mäts pH, total hårdhet och ledningsförmåga i kontrollgruppen (kontrollgrupperna) och i den högsta koncentrationen av testkemikalien. I semistatiska förnyelsesystem bör pH mätas före och efter förnyelse. Koncentrationen av upplöst syrgas mäts i slutet av testet i negativa kontroller och i den högsta testkoncentrationen med livskraftiga embryon, där den ska överensstämma med testets giltighetskriterierna (se punkt 8f). Om det finns risk för temperaturvariationer mellan 24-hålsplattorna mäts temperaturen i tre slumpmässigt utvalda kärl. Temperaturen bör helst registreras kontinuerligt under testet eller åtminstone dagligen.
36. I ett statistiskt system bör koncentrationen av testkemikalien mätas åtminstone i de högsta och lägsta testkoncentrationerna, men helst i alla behandlingar, i början och slutet av testet. Vid semistatiska test (förnyelsetest) där det förväntas att testkemikaliekoncentrationen kommer att hållas inom $\pm 20\%$ av de nominella värdena är det tillräckligt att analysera de högsta och lägsta testkoncentrationerna åtminstone när de är nyberedda och strax före förnyelsen. Vid test där testkemikalies koncentration inte förväntas hållas inom $\pm 20\%$ av den nominella koncentrationen måste alla testkoncentrationer analyseras, när de är nyberedda och omedelbart före förnyelse. Om det inte finns en tillräcklig volym för analysen kan det vara lämpligt att använda ersättningsbehållare av samma material och med samma förhållande mellan volym och yta som 24-hålsplattor. Det rekommenderas starkt att resultaten baseras på de uppmätta koncentrationerna. När koncentrationerna inte håller sig inom 80–120 % av den nominella koncentrationen bör effektkoncentrationerna uttryckas i förhållande till de uppmätta koncentrationernas geometriska medelvärde (se kapitel 5 i OECD:s vägledningsdokument nr 23 om akvatisk toxicitetstestning av svåra ämnen och blandningar för närmare uppgifter (28).

LIMIT-TEST

37. Genom användning av de förfaranden som beskrivs i denna testmetod kan ett så kallat limit-test göras upp till 100 mg/l testkemikalie eller upp till kemikalies löslighetsgräns i testmediet (den av dessa koncentrationer som är lägst) för att visa att LC_{50} är högre än denna koncentration. Limit-test bör utföras med 20 embryon i behandlingen, i den positiva kontrollen och om nödvändigt i lösningsmedelskontrollen. I den negativa kontrollen bör 24 embryon användas. Om procentandelen dödlighet i den testade koncentrationen överstiger dödligheten i den negativa kontrollen (eller lösningsmedelskontrollen) med 10 % bör en fullständig undersökning göras. Eventuella observerade effekter bör registreras. Om dödligheten överstiger 10 % i den negativa kontrollen (eller lösningsmedelskontrollen) blir testet ogiltigt och bör göras om.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

38. I detta test anses de individuella hålen vara oberoende replikat för statistisk analys. Procentandelen embryon för vilka minst en av de apikala observationerna är positiv vid 48 och/eller 96 timmar plottas mot testkoncentrationerna. Lämpliga statistiska metoder (38) bör användas för att beräkna kurvornas lutningar, LC_{50} -värden och konfidensgränser (95 %) och OECD:s vägledningsdokumentet *Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data* bör konsulteras (39).

Testrapport

39. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

Monokomponentämne:

— fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,

- kemiska beteckningar, såsom IUPAC- eller CAS-beteckning, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturformel, renhet, kemisk beteckning på orenheter i förekommande fall och om möjligt osv. (inklusive organisk kolhalt i förekommande fall),

Multikomponentämne, UVCB-ämne och blandning:

- karakteriseras så långt som möjligt genom kemisk beteckning (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.

Testorganismer:

- vetenskapligt namn, stam, härkomst och metod för insamling av befruktade ägg och efterföljande hantering.

Testbetingelser:

- använt testförfarande (t.ex. semistatisk förnyelse),
- fotoperiod,
- testets utformning (t.ex. antal testbehållare, typer av kontroller),
- kvaliteten på det vatten som fisken hålls i (t.ex. pH, hårdhet, temperatur, ledningsförmåga, upplöst syre),
- koncentration av upplöst syre, pH, total hårdhet, temperatur och ledningsförmåga för provlösningarna i början och efter 96 timmar,
- metod för beredning av stamlösningar och testlösningar samt förnyelsefrekvens,
- motivering för användning av lösningsmedel och valet av lösningsmedel, om annat än vatten,
- nominella testkoncentrationer och resultatet av alla analyser för att bestämma koncentrationen av testkemikalien i testkärlen, metodens återhämtningskapacitet och kvantifieringsgräns (LoQ) bör också rapporteras,
- bevis för att kontrollerna uppfyller de allmänna giltighetskriterierna för överlevnad,
- äggens befruktningsgrad,
- kläckningsgrad i behandlings- och kontrollgrupperna.

Resultat:

- högsta koncentration som inte orsakar dödlighet under testets varaktighet,
- minsta koncentration orsakar 100 % dödlighet under testets varaktighet,
- kumulativ dödlighet för varje koncentration vid de rekommenderade observationstiderna,
- LC_{50} -värden efter 96 timmar (och eventuellt efter 48 timmar) för dödlighet med 95 % konfidensintervall, om möjligt,
- diagram över koncentrations-dödlighetskurvan i slutet av testet,
- dödlighet i kontrollerna (negativa kontroller, interna kontroller av plattan samt positiv kontroll och eventuella lösningsmedelskontroller,
- data om resultatet av var och en av de fyra apikala iakttagelserna,
- förekomst och beskrivning av morfologiska och fysiologiska abnormiteter, om några (se exempel i tillägg 5, figur 2),
- händelser under testet som kan påverka resultatet,

- statistisk analys och behandling av data (probitanalys, logistisk regressionsmodell och geometriskt medelvärde för LC_{50}),
- lutning och konfidensintervall för regressionen av den (transformerade) koncentrations-responskurvan,

Eventuella avvikelser från testmetoden och relevanta förklaringar.

Diskussion och tolkning av resultaten.

LITTERATUR

- (1) OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Del I och II. Series on Testing and Assessment nr 157, OECD, Paris.
- (2) OECD (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Del I och II (bilagor). Series on Testing and Assessment nr 179, OECD, Paris.
- (3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. och 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) Internationella standardiseringsorganisationen.
- (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. och 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*). Doktorsavhandling, Tekniska universitetet i Dresden, Tyskland.
- (8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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) Kapitel C.4 i denna bilaga: Bestämning av "lätt" bionedbrytbarhet.
- (18) Kapitel C.29 i denna bilaga: Lätt bionedbrytbarhet – CO₂ i förslutna kärl (headspace-test).
- (19) 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) Incardonai, 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 denna bilaga: Korttidstest av reproduktion hos fisk. Se tillägg 4a.
- (24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, 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., 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.
- (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) International Standards. Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Genomflödesmetoden. Finns på [<http://www.iso.org>].
- (28) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment nr 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*). Femte upplagan. 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) Europeiska kommissionen (2007): Kommissionens rekommendation 2007/526 / EG av den 18 juni 2007 om riktlinjer för hållande och skötsel av djur som används för försök och andra vetenskapliga ändamål (delgivet med nr C (2007) 2525) [<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:SV:PDF>]
- (33) Europeiska unionen (2010): Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål. EUT L 276, 20.10.2010, s. 33.

- (34) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). J. Appl. Ichthyol. 2: 173–181.
 - (35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. och Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253–310.
 - (36) Kapitel C.2 i denna bilaga: Test av akut immobilisering av *Daphnia*-arter.
 - (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) Internationell standard Water quality – Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Finns på [<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 nr 54. OECD, Paris.
 - (40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper "Fish embryo toxicity assays". UBA-rapport enligt kontrakt nr 20385422, tyska federala miljömyndigheten, Berlin. s. 298 ff.
-

Tillägg 1

DEFINITIONER

Apikal endpoint: orsakar effekter på populationsnivå.

Blastula: En cellbildning kring djurets pol som täcker en viss del av gulan.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Epiboli: en massiv förökning av främst överhudceller i embryots gastrulafas och embryots rörelse från rygg- till buksidan, varigenom entodermala cellager internaliseras i en invagineringsliknande process och gulan införlivas i embryot.

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

Intern kontroll av plattan: intern kontroll som utförs genom att fyra hål per 24-hålsplatta fylls med utspädningsvatten för att identifiera eventuell förorening av plattorna som orsakats av tillverkaren eller forskaren under förfarandet och eventuella effekter av plattan som kan påverka testresultatet (t.ex. temperaturstigning).

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

Underhållsvatten: det vatten där de vuxna fiskarna hålls.

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

Semistatiskt testförfarande med regelbunden förnyelse av testlösning: test med regelbunden förnyelse av testlösningar vid fastställda perioder (t.ex. var 24:e timme).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Somit: hos utvecklande vertebratembryon är somiter massor av mesoderm som är lateralt fördelade till neuralröret och så småningom utvecklar läderhud (dermatom), skelettmuskler (myotom) och revben (sklerotom).

Statiskt test: ett test där testlösningarna förblir oförändrade under hela testet.

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

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

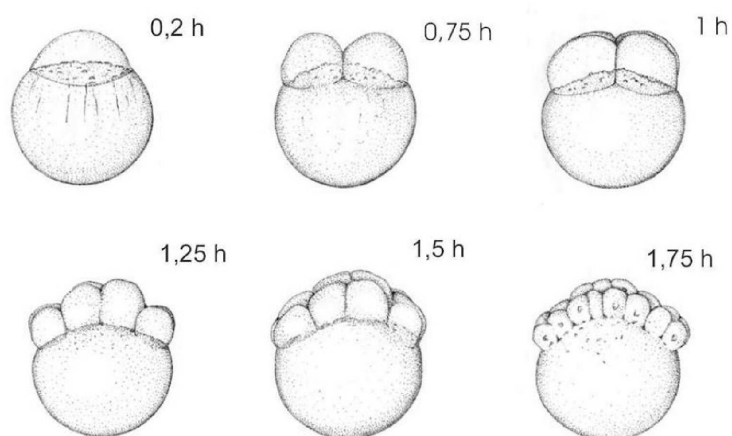
Tillägg 2

UNDERHÅLL, UPPFÖDNING OCH TYPISKA FÖRHÅLLANDEN FÖR AKUT TOXICITETSTEST AV SEBRAFISKEMBRYON

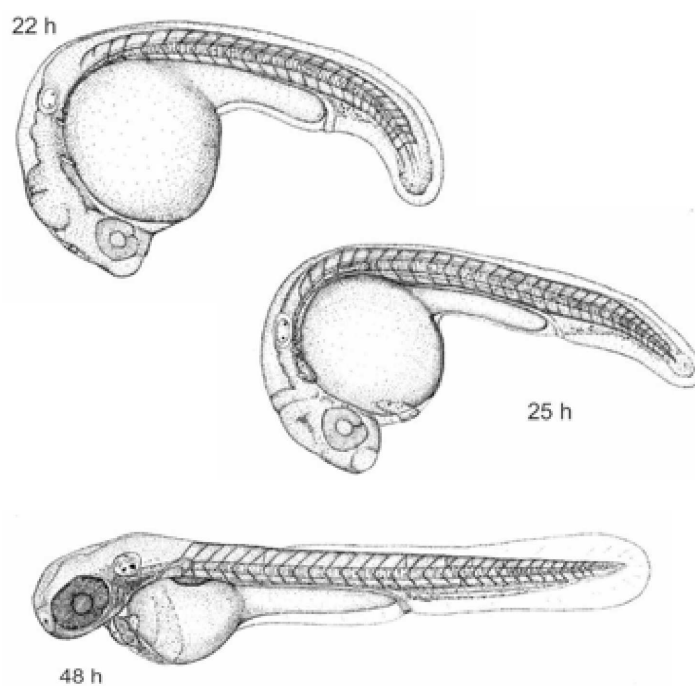
Sebrafisk (<i>Danio rerio</i>)		
Arternas ursprung	Indien, Burma, Malacka, Sumatra	
Könsdimorfism	Honor: utskjutande mage när de bär ägg. Hanar: slankare, orange nyans mellan blå längsgående ränder (särskilt tydligt vid analfenan).	
Utfodring	Torrflingfoder (max. 3 % fiskens vikt per dag) 3–5 gånger dagligen, dessutom naupliuslarver av saltkräftor (<i>Artemia</i>) och/eller små hinnkräftor (<i>Daphnia</i>) av lämplig storlek från en oförorenad källa. Utfodring med levande foder innebär en miljöberikning och levande foder bör därför ges när så är möjligt. För att garantera optimal vattenkvalitet bör matrester och avföring avlägsnas cirka en timme efter utfodring.	
Ungefärlig vikt för en vuxen fisk	Honor: 0,65 ± 0,13 g Hanar: 0,5 ± 0,1 g	
Underhåll av föräldrafiskar	Belysning	Fluorescerande lampor (brett spektrum), 10–20 µE/m ² /s, 540–1080 lux, eller 50–100 ft-c (liknande ljuset i laboratoriet), 12–16 timmars ljusperiod.
	Vattentemperatur	26 ± 1 °C.
	Vattenkvalitet	O ₂ ≥ 80 % mättnad, hårdhet: t.ex. ~30–300 mg/l CaCO ₃ , NO ₃ ⁻ ≤ 48 mg/l, NH ₄ ⁺ och NO ₂ ⁻ < 0,001 mg/l, restklor < 10 µg/l, totalt organiskt klor < 25 ng/l, pH = 6,5–8,5.
	Ytterligare kriterier för vattenkvalitet	Partiklar < 20 mg/l, totalt organiskt kol < 2 mg/l, total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska fosforföreningar < 50 ng/l, total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska klorföreningar plus polyklorerade bifenylar < 50 ng/l.
	Tankstorlek för underhåll	t.ex. 180 liter, 1 fisk/l.
	Vattenrening	Permanent (kolfilterad), andra möjligheter är kombinationer med semistatiskt förnyelseunderhåll eller genomflödessystem med kontinuerlig vattenförnyelse.
	Rekommenderad kvot hanar/honor för uppfödning	2:1 (eller masslek).
Lektankar	T.ex. 4-literstankar utrustade med stålätbotten och konstgjorda växter som lekstimulans, externa värmemattor eller masslek i underhållstankar.	
Äggens struktur och utseende	Stabil yttre fosterhinna (dvs. mycket transparent, ej klibbig, diameter ~ 0,8–1,5 mm).	
Äggläggning	En enda mogen hona lägger minst 50–80 ägg per dag. Beroende på stam kan antalet ägg vara avsevärt högre. Befruktningsgraden bör vara ≥ 70 %. För fisk som leker första gången kan äggens befruktningsgrad vara lägre vid de första äggläggningstillfällena.	
Testtyp	Statisk, semistatisk förnyelse, genomflöde, 26 ± 1 °C, 24-timmars konditionerade testbehållare (t.ex. 24-hålsplattor, 2,5–5 ml per hål).	

Tillägg 3

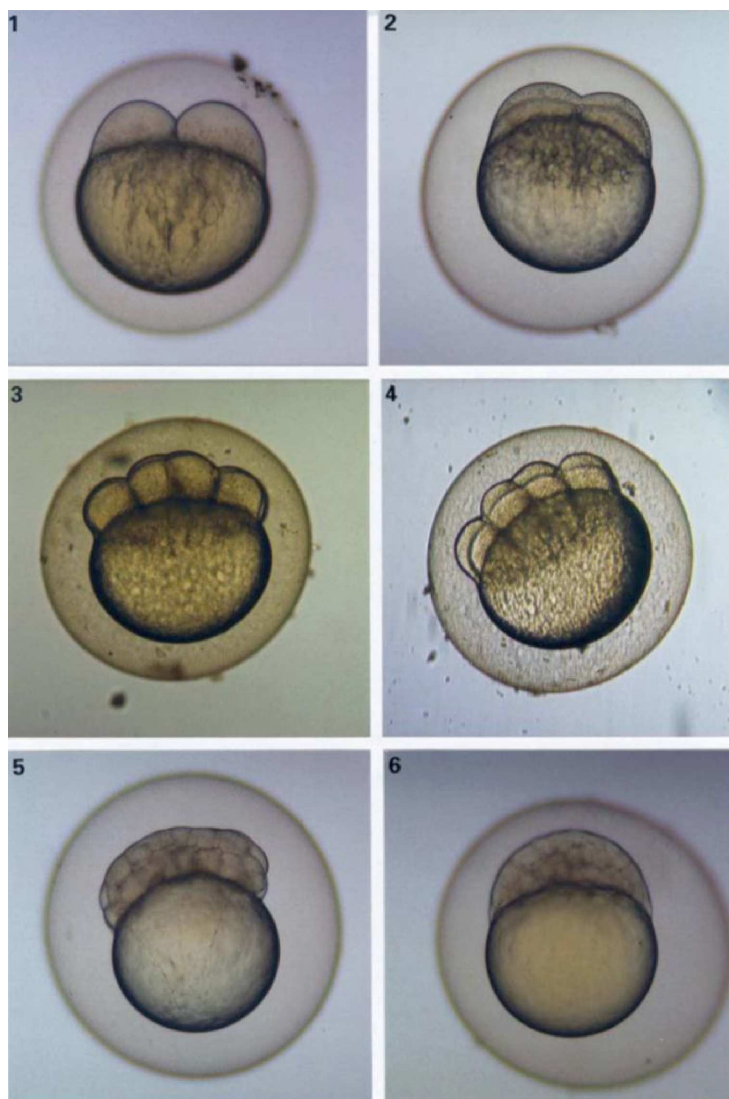
NORMAL UTVECKLING AV SEBRAFISK VID 26 °C



Figur 1: Valda tidiga utvecklingsstadier för sebrafisk (*Danio rerio*): 0,2–1,75 timmar efter befruktning (från Kimmel m.fl., 1995 (35)). Tidssekvensen för normal utveckling kan användas för att fastställa både befruktning och äggens livskraft (se punkt 26: Urval av befruktade ägg).



Figur 2: Valda sena utvecklingsstadier för sebrafisk (*Danio rerio*) (embryona tas ur den yttre fosterhinnan för optimerad synlighet): 22–48 timmar efter befruktning (från Kimmel m.fl., 1995 (35)).

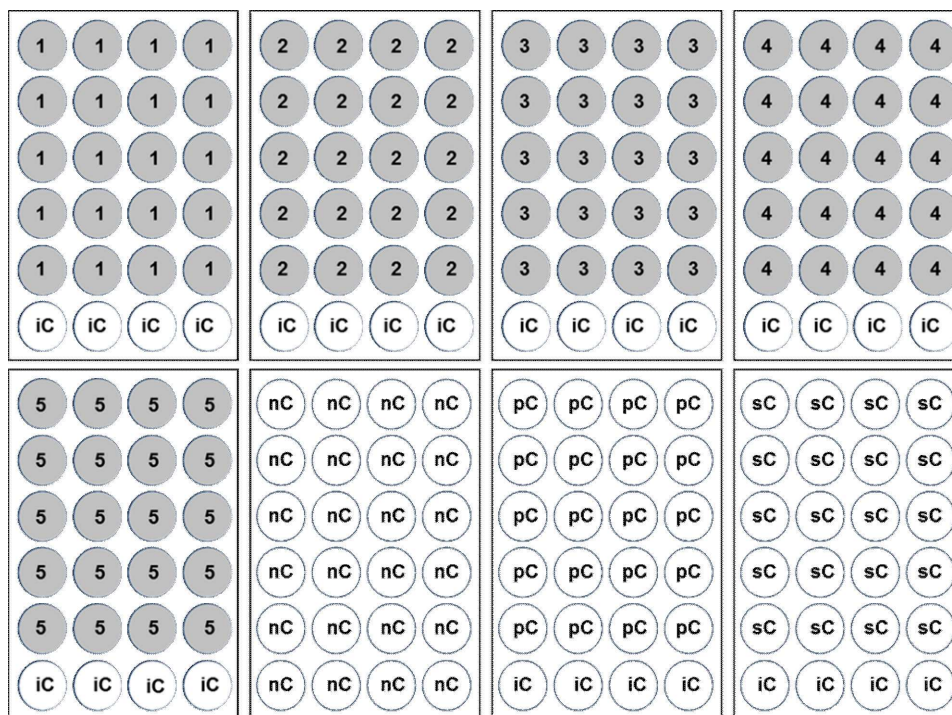


Figur 3: Normal utveckling för sebrafiskembryon (*Danio rerio*): 1) 0,75 tim., 2-cellstadiet, 2) 1 tim., 4-cellstadiet, 3) 1,2 tim., 8-cellstadiet, 4) 1,5 tim., 16-cellstadiet, 5) 4,7 tim. epiboli inlets, 6) 5,3 tim., cirka 50 % epiboli (från Braunbeck & Lammer 2006 (40)).

Tillägg 4

Figur 1

Utformning av 24-hålsplattor



1–5 = fem testkoncentrationer/kemikalie,

nC = negativ kontroll (utspädningsvatten),

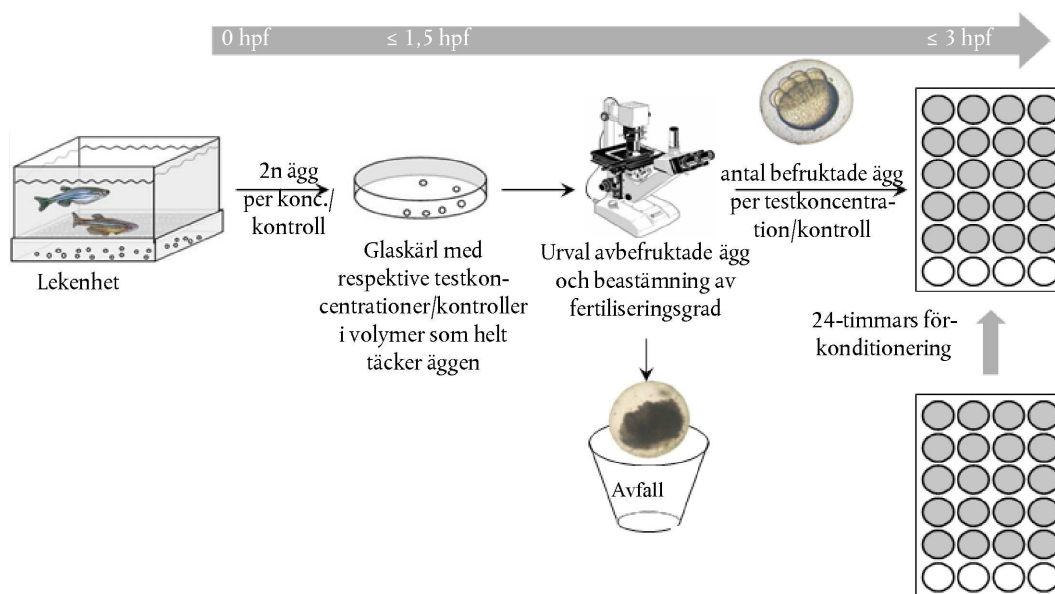
iC = intern kontroll av plattor (utspädningsvatten),

pC = positiv kontroll (3,4-DCA 4mg/l),

sC = lösningsmedelskontroll.

Figur 2

Översikt av testförfarandet för akut toxicitet hos sebrafiskembryon (från vänster till höger): äggproduktion, insamling av ägg, förexponering omedelbart efter befruktning i glaskärl, urval av befruktade ägg med inverterat mikroskop eller kikare, samt fördelning av befruktade ägg till 24-hålsplattor som förberetts med respektive testkoncentrationer/kontroller, n = antal ägg som krävs per testkoncentration/kontroll (här 20), hpf = timmar efter befruktning.



Tillägg 5

ÖVERSIKT AV DÖDLIGA ENDPOINTS FÖR AKUT TOXICITETSTEST HOS SEBRAFISKEMBRYON.

Följande apikala endpoints indikerar akut toxicitet och därmed dödlighet för embryon: *koagulering av embryot, ej lossad svans, avsaknad av somitbildning och avsaknad av hjärtslag*. Följande mikroskopbilder har valts ut för att illustrera dessa endpoints:

Figur 1

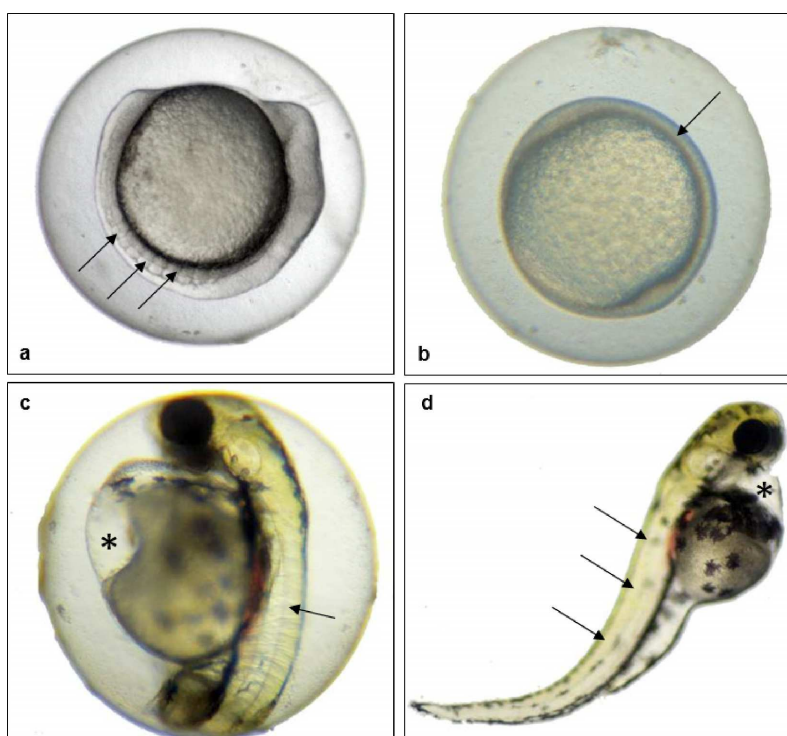
Koagulering av embryot:



I ljusfältsbelysning visar koagulerade sebrafiskembryon en variation av ogenomskinliga inneslutningar.

Figur 2

Avsaknad av somitbildning:



Även om utvecklingen försenas med cirka 10 timmar visar det 24 timmar gamla sebrafiskembryot i a) välutvecklade somiter (→), medan embryot i b) inte visar några tecken på somitbildning (→). Även om det 48 timmar gamla sebrafiskembryot i c) har en uttalad blödning i gulesäcken (*) uppvisar det en annorlunda somitbildning (→), medan det 96 timmar gamla sebrafiskembryot som avbildas i d) inte visar några tecken på somitbildning (→). Notera också ryggradskrökningen (skolios) och blödningen i hjärtsäcken (*) hos det embryo som visas i d).

Figur 3

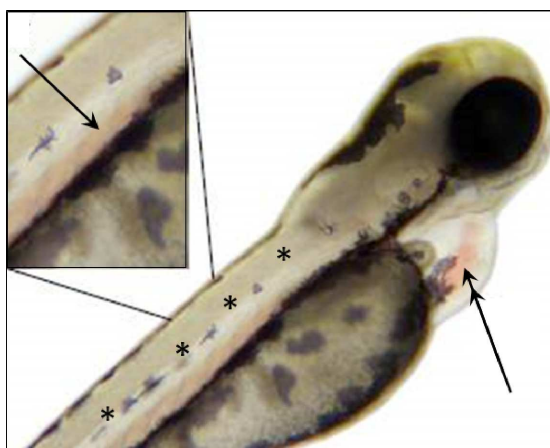
Ej avlossad svansknopp i sidovy



(a: →, 96 timmar gammalt sebrafiskembryo). Notera också avsaknaden av ögonknopp (*).

Figur 4

Avsaknad av hjärtslag



Avsaknad av hjärtslag är per definition svårt att illustrera i en mikroskopbild. Avsaknad av hjärtslag påvisas genom avsaknad av sammandragningar av hjärtat (dubbelpilen). Orörliga blodkroppar, t.ex. aorta abdominalis (→ insticksbilden) är inte en indikator på avsaknad av hjärtslag. Notera också avsaknaden av somitbildning hos detta embryo (*, homogent snarare än segmentellt utseende hos muskelfävnader). Observationstiden för att registrera avsaknad av hjärtslag bör vara minst en minut med en minsta förstoring på 80 x.

C.50 Toxicitetstest utan sediment på *Myriophyllum spicatum*

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje 238 (2014). Den är utformad för att bedöma kemikaliers toxicitet för *Myriophyllum spicatum* (axslinga), en submers tvåhjärtbladig växt som hör till slingesläktet. Testet baseras på en befintlig ASTM-testmetod (1) som har modifierats till ett testsystem utan sediment (2) för att uppskatta testkemikaliernas inneboende ekotoxicitet (oberoende av testkemikalens fördelningsbeteende mellan vatten och sediment). Testsystem utan sediment har en låg analytisk komplexitet (endast i vattenfasen) och resultaten kan analyseras parallellt och/eller jämföras med de resultat som erhöles i testet av flytbladsväxten *Lemna* sp. (3). Eftersom testet kräver sterila förhållanden kan man dessutom begränsa effekterna av mikroorganismer och alger (kemisk upptagning/nedbrytning osv.) i så stor utsträckning som möjligt. Detta test ersätter inte andra akvatiska toxicitetstester, utan bör snarare komplettera dessa tester för att möjliggöra en mer fullständig risk- och farobedömning för vattenväxter. Testmetoden har validerats i en provningsjämförelse (4).
2. Dokumentet innehåller ingående beskrivningar av testförfaranden med regelbunden förnyelse av testlösningar (semistatistiskt test) och utan förnyelse av testlösningar (statistiskt test). Beroende på lagstadgade krav och syftet med testet rekommenderas användning av ett semistatistiskt testförfarande, t.ex. för ämnen som snabbt försvinner ur lösningen genom avdunstning, adsorption, ljusnedbrytning, hydrolys, utfällning eller biologisk nedbrytning. Närmare vägledning finns i (5). Denna testmetod gäller ämnen för vilka testmetoden har validerats (närmare uppgifter finns i rapporten från provningsjämförelsen (4)), beredningar eller kända blandningar. Om en blandning testas bör dess beståndsdelar identifieras och kvantifieras så långt som möjligt. Testmetoden utan sediment på *Myriophyllum spicatum* kompletterar toxicitetstestet med vatten-sediment på *Myriophyllum spicatum* (6). Innan testmetoden för lagstadgad testning av en blandning används bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag.

TESTPRINCIP

3. Kontinuerligt växande plantkulturer av *Myriophyllum spicatum* (endast i ett modifierat Andrewsmedium, se tillägg 2) får växa som monokulturer i olika koncentrationer av testkemikalien under en period av 14 dagar i ett testsystem utan sediment. Syftet är att genom bestämning av utvalda mätvariabler kvantifiera testkemikalens effekter på tillväxten under tiden för testets genomförande. Mätvariabler är skottens tillväxt i längd, sidogrenar och rötter samt utveckling av färsk- och torrsvikt och ökning av kransar. Dessutom tas hänsyn till utmärkande kvalitativa förändringar hos testorganismerna, t.ex. missformning eller kloros och nekros, som visar sig genom en gulnande eller vit och brun färg. För att kvantifiera testkemikalens effekter jämförs tillväxten i testlösningarna med tillväxten i kontrollerna. Därefter bestäms den koncentration som åstadkommer en bestämd procent (x) av tillväxthämning. Denna koncentration betecknas som EC_x , där värdet "x" beror på vilka lagstadgade krav som gäller, t.ex. EC_{10} , EC_{20} , EC_{50} . Det bör noteras att uppskattningarna av värdena EC_{10} och EC_{20} endast är tillförlitliga och lämpliga för tester där kontrollväxternas variationskoefficienter faller under den uppskattade effektnivån, dvs. variationskoefficienterna bör vara < 20 % för en stabil uppskattning av ett EG_{20} -värde.
4. Både genomsnittlig specifik tillväxtgrad (uppskattas genom bedömningar av huvudskottets längd och ytterligare tre mätvariabler) och producerad mängd biomassa (uppskattas genom en beräkning av ökningen av huvudskottets längd och ytterligare tre mätvariabler) hos obehandlade och behandlade plantor bör bestämmas. Specifik/a tillväxtgrad/er (r) och utbyte (y) används sedan för att bestämma E_rC_x (t.ex. E_rC_{10} , E_rC_{20} , E_rC_{50}) respektive E_yC_x (t.ex. E_yC_{10} , E_yC_{20} , E_yC_{50}).
5. Den lägsta koncentrationen med observerad effekt (LOEC) och den högsta koncentrationen utan observerad effekt (NOEC) kan också bestämmas statistiskt.

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

6. Man bör ha tillgång till en analysmetod som är tillräckligt känslig för kvantitetsbestämning av testkemikalien i testmediet. Bland annat följande uppgifter om testkemikalien kan vara av värde när man fastställer testbetingelserna: strukturformel, renhetsgrad och föroreningsgrad, vattenlöslighet, stabilitet i vatten och ljus, syradissociationskonstant (pK_a), fördelningskoefficient oktanol/vatten (K_{ow}), ångtryck och biologisk nedbrytbarhet. Löslighet i vatten och ångtryck kan användas för att beräkna Henrys konstant, som visar om det är sannolikt att förlusterna av testkemikalien under tiden för testets genomförande kommer att vara betydande. Detta ger en indikation på om man behöver vidta åtgärder för att kontrollera dessa förluster. Om uppgifterna om testkemikalies löslighet och stabilitet är osäkra, bör man bedöma dessa egenskaper under testbetingelserna, dvs. i det odlingsmedium, vid den temperatur och under de belysningsförhållanden som används i testet.
7. pH-kontrollen av testmediet är särskilt viktig, t.ex. när man testar metaller eller ämnen som är hydrolytiskt instabila. Närmare vägledning för testning av kemikalier vars fysikalisk-kemiska egenskaper gör dem svåra att testa finns i OECD:s vägledningsdokument (5).

TESTETS GILTIGHET

8. För att testet ska vara giltigt måste fördubblingstiden för huvudskottets längd i kontrollen vara mindre än 14 dagar. Med testmedier och testbetingelser som beskrivs för den aktuella testmetoden kan detta kriterium uppfyllas med ett statistiskt eller semistatistiskt testförfarande.
9. Den genomsnittliga variationskoefficienten för utbyte baserat på mätningar av skottens färskvikt (dvs. från början till slutet av testet) och ytterligare mätvariabler (se punkt 37) i kontrollkulturerna får inte överskrida 35 % mellan replikaten.
10. Mer än 50 % av replikaten i kontrollgruppen hålls sterila under den 14 dagar långa exponeringstiden, vilket innebär att de är fria från synliga föroreningar av andra organismer såsom alger, svampar och bakterier (klar lösning). *Anmärkning:* Vägledning om sterilitetsbedömning ges i rapporten från provningsjämförelsen (4).

REFERENSKEMIKALIE

11. Referenskemikalier, t.ex. 3,5-diklorfenol som används i provningsjämförelsen (4), kan testas som ett sätt att kontrollera testförandet. Enligt data från provningsjämförelsen ligger de genomsnittliga EG_{50} -värdena av 3,5-DCP för olika responsvariabler (se punkterna 37–41 i denna testmetod) mellan 3,2 mg/l och 6,9 mg/l (se rapporten om provningsjämförelsen för information om konfidensintervall för dessa värden). Det är lämpligt att testa en referenskemikalie minst två gånger per år eller, om testen utförs mer sällan, parallellt med fastställandet av en testkemikalies toxicitet.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Utrustning

12. All utrustning som befinner sig i kontakt med testmedier ska vara av glas eller annat kemiskt inert material. Glasutrustning som används för odling och test ska vara rengjord från kemiska föroreningar som kan läcka in i testmediet, och glaset ska vara sterilt. Testkärnen bör vara tillräckligt långa för att skotten i kontrollkärnen under vattenfasen ska kunna växa utan att nå testmediets yta i slutet av testet. Glasprovrör med tjocka väggar av borsilikatglas utan pip med en innerdiameter på cirka 20 mm, en längd på cirka 250 mm och aluminiumlock rekommenderas.
13. Eftersom det modifierade Andrewsmediet innehåller sackaros (som stimulerar tillväxten av svampar och bakterier) måste testlösningarna framställas under sterila förhållanden. Alla vätskor samt utrustning steriliseras före användning. Sterilisering sker genom varmluftsbehandling (210 °C) i fyra timmar eller autoklavering i 20 minuter vid 121 °C. Dessutom ska alla kolvar, tallrikar, skålar osv. och annan utrustning genomgå flambehandling på en steril arbetsbänk strax före användning.

14. Kulturer och provkärn får inte förvaras tillsammans. Bäst är att använda separata klimatodlingskammare, inkubatorer eller klimatrum. Belysning och temperatur bör kunna regleras och hållas på konstant nivå.

Testorganism

15. *Myriophyllum spicatum* (axslinga) – en submers tvåhjärtbladig växt – hör till slingeläktet. Mellan juni och augusti sticker nästan omärkliga rosa-vita blommor upp ovanför vattenytan. Växterna är rotade i botten genom ett system av robusta jordstammar och förekommer på hela norra halvklotet i näringsrika, ej förorenade och kalkrika stillastående vatten med lerigt substrat. Axslinga föredrar sötvatten, men förekommer även i bräckt vatten.
16. För toxicitetstest utan sediment krävs sterila växter. Om testlaboratoriet inte har regelbundna axslingekulturer kan sterilt växtmaterial erhållas från ett annat laboratorium. Icke-sterilt växtmaterial kan också samlas in från naturen eller tillhandahållas av en kommersiell leverantör. Om plantorna tas från naturen bör man göra en taxonomisk kontroll av arten. Om plantorna samlas in från naturen eller tillhandahålls av en kommersiell leverantör bör de steriliseras (1) och hållas i samma medium som används för testet under minst åtta veckor. Det får inte finnas några uppenbara kontaminationskällor på platser som används för insamling i naturen. Om axslinga samlas in från naturen är det viktigt att mycket noggrant fastställa att rätt art samlas in, särskilt i regioner där axslingan kan hybridisera med andra arter från slingeläktet. Växtmaterial som införskaffas från andra laboratorier ska förvaras under minst tre veckor på samma sätt som plantor från naturen. Om ursprunget är känt ska detta alltid redovisas för växtmaterialet och de arter som används för testet.
17. Kvaliteten och enhetligheten hos plantorna som används för testet har stor betydelse för testresultatet, och de bör därför väljas ut med omsorg. Man bör använda unga, snabbväxande plantor utan synliga skador eller missfärgningar (p.g.a. kloros). Uppgifter om beredningen av testorganismen ges i tillägg 4.

Odling

18. För att göra odlingen mindre arbetskrävande – t.ex. när inga tester av axslinga är inplanerade under en längre tid – kan kulturerna förvaras i reducerad belysning och temperatur ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $20 \pm 2^\circ\text{C}$). Uppgifter om odling finns i tillägg 3.
19. Minst 14–21 dagar före testet förs en tillräcklig mängd testorganismer aseptiskt över till färskt medium och odlas under 14–21 dagar under testbetingelser som en förkultur. Uppgifter om beredning av en förkultur ges i tillägg 4.

Testmedium

20. Endast ett näringsmedium rekommenderas för *Myriophyllum spicatum* i ett testsystem utan sediment, enligt beskrivningen i tillägg 2. En modifiering av Andrews medium rekommenderas för odling och testning med *Myriophyllum spicatum*, enligt beskrivningen i (1). Det modifierade Andrewsmediet fås fram med fem separat beredda näringsstamlösningar med 3 % sackaros. Uppgifter om beredning av mediet ges i tillägg 2.
21. För att få fram testlösningarna krävs ett tiofaldigt koncentrerat modifierat Andrewsmedium (i förekommande fall genom utspädning) Sammansättningen hos Andrews medium anges i tillägg 2.

Testlösningar

22. Testlösningarna bereds vanligtvis genom utspädning av en stamlösning. Stamlösningar av testkemikalien bereds normalt genom att kemikalien löses upp i demineraliserat (dvs. destillerat eller avjonat) vatten. Tillsats av näringsämnen sker med hjälp av det tiofaldigt koncentrerade modifierade Andrewsmediet.

23. Testkemikaliens stamlösningar kan steriliseras genom autoklav vid 121 °C i 20 minuter eller genom steril filtrering, förutsatt att den använda steriliseringstekniken inte denaturerar testkemikalien. Testlösningarna kan också beredas i sterilt demineraliserat vatten eller medier, under sterila förhållanden. Termostabilitet och adsorption på olika ytor bör beaktas i valet av förfarandet för att sterilisera testkemikaliens stamlösningar. Stamlösningarna bör därför beredas under sterila förhållanden, dvs. med användning av sterila material för upplösning av testkemikalien (t.ex. flämssterilisering, draghuvar med laminärt flöde osv.) i sterilt vatten. Denna teknik för beredning av sterila stamlösningar gäller både ämnen och blandningar.
24. Den högsta koncentrationen av testkemikalien bör normalt inte överskrida dess vattenlöslighet under testbetingelserna. För testkemikalier med låg vattenlöslighet kan det vara nödvändigt att bereda en koncentrerad stamlösning eller en dispersion med hjälp av ett organiskt lösningsmedel eller dispergeringsmedel för att underlätta tillsatsen av exakta mängder testkemikalie i testmediet och bidra till dispergeringen och upplösningen av kemikalien. Man bör därför så långt som möjligt undvika att använda sådana ämnen. Det får inte uppstå fytotoxicitet på grund av att man tvingas använda lösnings- eller dispergeringsmedel för att bereda testlösningen. Exempel på vanliga lösningsmedel som inte förorsakar fytotoxicitet vid koncentrationer upp till 100 µl/l är aceton och dimetylformamid. Om ett lösnings- eller dispergeringsmedel används bör dess slutkoncentration redovisas och hållas så låg som möjligt ($\leq 100 \mu\text{l/l}$). Alla test- och kontrolllösningar bör ha samma koncentration av lösnings- eller dispergeringsmedel. Mer information om användningen av dispergeringsmedel finns i (5).

Test- och kontrollgrupper

25. Förkunskap om testkemikaliens toxicitet för *Myriophyllum spicatum*, erhållen genom ett preliminärt test av koncentrationsintervallet för toxiciteten, underlättar valet av lämpliga testkoncentrationer. I det slutliga toxicitetstestet bör det i regel finnas fem (precis som i testet av tillväxthämning hos *Lemna sp.*, se kapitel C.26 i denna bilaga) till sju testkoncentrationer som är arrangerade i geometriska serier. De bör väljas så att NOEC och EC_{50} -värdena ligger innanför koncentrationsintervallet (se nedan). Separationsfaktorn mellan testkoncentrationerna bör inte överskrida 3,2, men om dos-respons-kurvan är flack kan en större separationsfaktor användas. Om färre än fem koncentrationer används måste detta motiveras. Minst fem replikat ska användas för respektive testkoncentration.
26. När man fastställer intervallet av testkoncentrationer (för det preliminära testet eller för det slutliga toxicitetstestet), ska man beakta följande:

För att bestämma en EC_x -koncentration ska värdet på EC_x ligga innanför intervallet för testkoncentrationerna för att man ska uppnå en lämplig konfidensgrad. Om man t.ex. ska bestämma EC_{50} ska den högsta testkoncentrationen vara högre än värdet på EC_{50} . Om värdet på EC_{50} ligger utanför intervallet för testkoncentrationerna blir motsvarande konfidensintervall stora, och det kan då bli omöjligt att korrekt bedöma modellens statistiska lämplighet.

Om syftet är att bestämma LOEC eller NOEC ska den lägsta testkoncentrationen vara så låg att tillväxten inte är märkbart mindre än tillväxten i kontrollen. Den högsta testkoncentrationen ska vara så hög att tillväxten är märkbart lägre än i kontrollen. Om dessa villkor inte är uppfyllda måste testet göras om med ett annat koncentrationsintervall (såvida inte den högsta koncentrationen ligger på löslighetsgränsen eller är lika med den högsta erforderliga gränskoncentrationen, t.ex. 100 mg/l).

27. Varje test bör inkludera kontroller som består av samma näringsämnesmedium, testorganismer (välj växtmaterial som är så enhetligt som möjligt, färska sidogrenar från förkulturer som kortas till 2,5 cm från basen), miljöförhållanden och förfaranden som testkärnen, men utan testkemikalien. Om ett lösnings- eller dispergeringsmedel används som hjälpmedel i testet krävs ytterligare en kontrollbehandling, nu med samma koncentration av lösnings- eller dispergeringsmedlet som i provkärnen med testkemikalien. Antalet replikat bör vara minst tio kontrollkärl (och lösningsmedelskärl om tillämpligt).

28. Om NOEC inte behöver bestämmas kan man ändra testupplägget så att antalet koncentrationer ökas medan antalet replikat per koncentration minskas. Antalet kontrollreplikat bör i alla händelser vara minst tio.

Exponering

29. Färska sidogrenar från förkulturen, avkortade till 2,5 från basen, fördelas slumpmässigt mellan testkärlen under aseptiska förhållanden. Varje testkärl bör innehålla en sidogren på 2,5 cm som bör ha ett spetsmeristem i ena änden. Det valda växtmaterialet bör vara av samma kvalitet i varje testkärl.
30. Provkärlen måste placeras slumpmässigt i inkubatorn för att minimera inflytandet av rumsbetingade skillnader i ljusintensitet och temperatur. Det krävs också blockvis fördelning eller slumpmässig omplacering av kärlen vid varje mättillfälle eller oftare.
31. Om ett preliminärt stabilitetstest visar att koncentrationen av testkemikalien inte kan upprätthållas (dvs. den uppmätta koncentrationen sjunker under 80 % av den uppmätta startkoncentrationen) under tiden för testets genomförande (14 dagar), bör ett semistatiskt testförfarande användas. I det fallet exponeras plantorna för nyberedda test- och kontrollösningar vid minst ett tillfälle under testet, t.ex. på dag 7. Intervallen för byte till färskt medium beror på stabiliteten hos testkemikalien. Det kan krävas kortare intervall för att upprätthålla nära nog konstanta koncentrationer av mycket instabila eller flyktiga kemikalier.
32. Exponering genom besprutning av bladen ingår inte i denna testmetod.

Testbetingelser

33. Belysning med varmt eller kallt vitt ljus från lysrör bör användas för att åstadkomma en ljusintensitet i intervallet $100\text{--}150\ \mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, varvid intensiteten mäts inom ett fotosyntetiskt aktivt våglängdsområde (400–700 nm) i punkter på samma avstånd från ljuskällan som testkärlens botten (motsvarande cirka 6 000–9 000 lux). Ljus-mörkerperioden ska vara 16:8 timmar. Metoden för detektering och mätning av ljuset, framför allt typen av ljussensor, påverkar mätvärdet. Sfäriska sensorer – som mäter ljuset från alla vinklar ovanför och under mätplanet – och sensorer av solsensortyp (med cosinusoefficient för infallsvinkeln) – som mäter ljuset från alla vinklar ovanför mätplanet – är att föredra framför riktade sensorer. De förstnämnda sensorerna ger större mätutslag för en diffus ljuskälla av den typ som beskrivits här.
34. Temperaturen i testkärlen bör vara $23 \pm 2\ ^\circ\text{C}$. I speciella fall, t.ex. vid test av instabila kemikalier eller metaller, måste förskjutningen av pH kontrolleras extra noggrant och pH bör hålla sig inom 6–9. Se (5) för ytterligare vägledning.

Löptid

35. Testet ska avslutas 14 dagar efter det att plantorna har placerats i provkärlen.

Mätningar och analytiska bestämningar

36. I början av testet är längden på testorganismens huvudskott 2,5 cm (se punkt 29). Längden mäts med en linjal (se tillägg 4) eller genom fotografering och bildanalys. De huvudskott hos testorganismen som framstår som normala respektive onormala bör bestämmas i början av testet och därefter minst en gång under den 14 dagar långa exponeringstiden samt när testet avslutas. Obs: Om man inte har bildanalys kan även en steril linjal användas för att mäta huvudskottets längd i början av och under testet. Arbetsbänken måste dock vara steriliserad innan växterna placeras i testkärlen. Registrera förändringar i plantutvecklingen. Det kan t.ex. gälla deformation av skotten, utseende, tecken på nekros, kloros, kollaps eller försämrad flytförmåga samt rötternas längd och utseende. Registrera också betydelsefulla inslag i testmediet, t.ex. förekomst av oupplöst material, alg tillväxt, svamp och bakterier i provkärlet.

37. Utöver bestämmningar av huvudskottets längd under testet bör de effekter testkemikalien har på tre eller flera av följande mätvariabler också bestämmas:

- i. Sidogrenarnas totala längd
- ii. Total skottlängd
- iii. Total rotlängd
- iv. Färskvikt
- v. Torrsvikt
- vi. Antal kransar

Anmärkning 1: De iakttagelser som gjorts under det preliminära testet kan vara till hjälp för att välja relevanta ytterligare mätningar bland de sex variabler som anges ovan.

Anmärkning 2: Bestämning av färsk- och torrsvikt (parametrarna iv och v) rekommenderas starkt.

Anmärkning 3: På grund av att sackaros och ljus (rötternas exponering för ljus under testet) kan påverka bärare av auxin (tillväxthormon hos växter), och vissa kemikalier kan ha ett verkningsätt som liknar auxinets effekter, kan användningen av endpoints för rötter (parameter iii) ifrågasättas.

Anmärkning 4: Resultat från provningsjämförelsen visar höga variationskoefficienter (> 60 %) för sidogrenarnas totallängd (parameter i). Sidogrenarnas totala längd ingår i alla händelser i mätningen av skottets totala längd (parameter ii), som visar mer godtagbara variationskoefficienter (< 30 %).

Anmärkning 5: På grundval av ovanstående överväganden rekommenderas mätningar av följande huvudsakliga endpoints: skottets totala längd samt färsk- och torrsvikt (parametrarna ii, iv och v). Parameter vi – antal kransar – lämnas åt testarens bedömning.

38. Fördelen med parametrarna huvudskottets längd och antal kransar är att de kan bestämmas för varje test- och kontrollkärl i början, under och i slutet av testet genom fotografi- och bildanalys, även om en steril linjal också kan användas.
39. Sidogrenarnas totala längd, total rotlängd (som en summa av alla sidogrenar eller rötter) samt total skottlängd (som en summa av huvudskottets och sidogrenarnas totala längd) kan mätas med en linjal i slutet av exponeringen.
40. Färsk- och/eller torrsvikt måste bestämmas i början av testet med hjälp av ett prov från förkulturen som är representativt för vad som används för att starta testet, och vid slutet av testet med hjälp av växtmaterial från alla prov- och kontrollkärl.
41. Sidogrenarnas totala längd, total skottlängd, total rotlängd, färsk- och torrsvikt samt antal kransar kan bestämmas enligt följande:
- i. Sidogrenarnas totala längd: Sidogrenarnas totala längd kan bestämmas genom att alla sidogrenar mäts med en linjal i slutet av exponeringen. Sidogrenarnas totala längd är summan av alla sidogrenar i varje test- och kontrollkärl.
 - ii. Total skottlängd: Huvudskottets längd kan bestämmas genom bildanalys eller med hjälp av en linjal. Total skottlängd är summan av sidogrenarnas totala längd och huvudskottets längd i varje test- och kontrollkärl i slutet av exponeringen.

- iii. Total rotlängd: Rotlängden kan bestämmas genom att alla rötter mäts med en linjal i slutet av exponeringen. Total rotlängd är summan av alla rötter i varje test- och kontrollkärl.
- iv. Färskvikt: Färskvikten kan bestämmas genom att testorganismerna vägs i slutet av exponeringen. Allt växtmaterial i varje test- och kontrollkärl sköljs med destillerat vatten och klappas torrt med cellulosapapper. Efter denna förberedelse bestäms färskvikten genom vägning. Den initiala biomassan (färskvikt) bestäms med hjälp av ett prov bestående av testorganismer från samma kultur som används för att ympa provkärlen.
- v. Torrsvikt: Efter förberedelserna för bestämning av färskvikt torkas testorganismerna vid 60 °C till konstant vikt. Denna massa är torrsvikten. Den initiala biomassan (torrsvikt) bestäms med hjälp av ett prov bestående av testorganismer från samma kultur som används för att ympa provkärlen.
- vi. Antal kransar: Alla kransar längs huvudskottet räknas.

Mätfrekvens och analytiska bestämningar

- 42. Vid statistiskt testförfarande ska pH-värdet i alla testlösningar (testkoncentrationer) mätas i början och slutet av testet. Vid semistatiskt testförfarande mäts pH-värdet i varje färsk testlösning före varje byte till ny lösning och i motsvarande förbrukade lösning.
- 43. Ljusintensiteten ska mätas i odlingskammaren, inkubatorn eller klimatrumsrummet i punkter på samma avstånd från ljuskällan som testorganismerna. Mätningar ska göras minst en gång under testets genomförande. Temperaturen hos mediet i ett ersättningskärl med enbart testmedium som hålls under samma betingelser i odlingskammaren, inkubatorn eller klimatrumsrummet bör registreras minst en gång per dag (eller kontinuerligt med en datalogg).
- 44. Under testets gång ska testkemikaliens eller testkemikaliernas koncentrationer bestämmas med lämpliga intervaller. Vid ett statistiskt testförfarande är minimikravet att koncentrationerna ska bestämmas i början och slutet av testet.
- 45. Om man vid ett semistatiskt testförfarande bedömer att koncentrationen av testkemikalien eller testkemikalierna inte kommer att ligga kvar inom $\pm 20\%$ av den nominella koncentrationen, måste man analysera alla nyberedda testlösningar liksom alla förbrukade lösningar vid byte till ny färsk lösning. För test i vilka den uppmätta startkoncentrationen av testkemikalien inte ligger inom $\pm 20\%$ av den nominella koncentrationen men tillräckliga bevis kan framläggas för att visa att startkoncentrationerna är repeterbara och stabila (dvs. inom intervallet 80–120 % av startkoncentrationen), räcker det om kemiska bestämningar utförs enbart för de högsta och lägsta testkoncentrationerna. I samtliga fall behöver bestämning av testkoncentrationer före byte till färsk testlösning bara utföras på ett enda replikatkärl för varje testkoncentration (eller på det samlade innehållet från samtliga replikat för respektive testkoncentration).
- 46. Om man kan visa att testkoncentrationen har hållits tillfredsställande inom $\pm 20\%$ av den nominella eller uppmätta startkoncentrationen genom hela testet kan analysen av resultaten baseras på nominella eller uppmätta startvärden. Om avvikelser från den nominella eller uppmätta startkoncentrationen inte ligger inom $\pm 20\%$, ska analysen av resultaten baseras på det geometriska medelvärdet av koncentrationen under exponeringen, eller på modeller som beskriver testkemikaliens avtagande koncentration (5).

Limit-test

- 47. Under vissa omständigheter, t.ex. när ett preliminärt test tyder på att testkemikalien inte har några toxiska effekter vid koncentrationer upp till 100 mg/l eller upp till dess löslighetsgräns i testmediet (eller om det är en beredning, upp till dispergeringsgränsen), kan man utföra ett limit-test. Man jämför då responsen mellan en kontrollgrupp och en testgrupp (med en koncentration på 100 mg/l eller lika med löslighetsgränsen). Det rekommenderas starkt att jämförelsen kompletteras med en bestämning av exponeringskoncentrationen. Alla testbetingelser samt kriterier för testresultatens giltighet som beskrivits tidigare gäller även för limit-test, med undantaget att antalet testreplikater ska vara dubbelt så stort. Tillväxten i kontrollgruppen och testgruppen kan analyseras med en statistisk metod för jämförelse av medelvärden, t.ex. t-test (Students t-test).

DATA OCH RAPPORTERING

Responsvariabler

48. Syftet med testet är att bestämma en testkemikalies effekter på tillväxten av *Myriophyllum spicatum*. Denna testmetod beskriver två responsvariabler.
- Genomsnittlig specifik tillväxthastighet: Denna responsvariabel beräknas med hjälp av den tidsmässiga förändringen av det logaritmiska värdet av huvudskottets längd, och den tidsmässiga förändringen av det logaritmiska värdet av en andra variabel, dvs. total skottlängd, färskvikt, torrsvikt eller antalet kransar över tiden (uttryckt i dagar) i kontrollerna och respektive testgrupp. Anmärkning: När det gäller mätparametern sidogrenarnas totala längd och total rotlängd är en beräkning av genomsnittlig tillväxthastighet inte möjlig. I början av testet har testorganismen inga sidogrenar och inga rötter (baserat på beredningen från förkulturen). Med utgångspunkt från värdet noll har beräkningen av den genomsnittliga tillväxthastigheten inte definierats.
 - Producerad mängd biomassa: Denna responsvariabel beräknas på grundval av ändringar av huvudskottets längd och ändringar av andra mätparametrar, företrädesvis total skottlängd, färskvikt, torrsvikt eller antalet kransar samt andra parametrar om de anses användbara, i kontrollerna och respektive testgrupp.
49. Uppskattningar av toxiciteten bör grundas på huvudskottets längd och tre ytterligare mätvariabler (företrädesvis total skottlängd, färskvikt, torrsvikt eller antalet kransar, se punkt 37 samt anmärkningarna 2, 4 och 5 till denna punkt), eftersom vissa kemikalier kan påverka andra mätvariabler mycket mer än huvudskottets längd. Denna effekt upptäcks inte om endast huvudskottets längd används som beräkningsmått.

Genomsnittlig specifik tillväxthastighet

50. Den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten för en given tidsperiod beräknas som den logaritmiska ökningen av tillväxtvariablerna – huvudskottets längd och tre ytterligare mätvariabler (dvs. total skottlängd, färskvikt, torrsvikt eller antalet kransar). Använd nedanstående formel för alla replikat av kontroll- och testlösningar:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

där

μ_{i-j} är genomsnittlig specifik tillväxthastighet från tidpunkten i till tidpunkten j,

N_i är värdet på mätvariabeln i prov- respektive kontrollkärlet vid tidpunkten i,

N_j är värdet på mätvariabeln i prov- respektive kontrollkärlet vid tidpunkten j, och

t är tidslängden mellan tidpunkterna i och j.

Beräkna ett medelvärde av tillväxthastigheten för varje testgrupp och kontrollgrupp tillsammans med variansskattningar.

51. Den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten ska beräknas för hela tiden för testets genomförande ("i" i formeln betecknar början av tiden för testets genomförande, och "j" slutet). Beräkna ett medelvärde av den genomsnittliga tillväxthastigheten för varje testkoncentration och kontrollgrupp tillsammans med variansskattningar. Bestäm dessutom tillväxthastigheten i olika skeden för att kunna bedöma testkemikaliens effekter under exponeringstiden (t.ex. genom analys av logaritmiska tillväxtkurvor).

52. Den procentuella tillväxthämningen (I_r) beräknas sedan för varje testkoncentration (testgrupp) med formeln

$$\%I_r = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100$$

där

$\% I_r$ är den procentuella minskningen av den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten,

μ_c är medelvärdet av μ i kontrollgruppen, och

μ_T är medelvärdet av μ i testgruppen.

Producerad mängd biomassa

53. Effekterna på producerad mängd biomassa bestäms med hjälp av mätvariabeln huvudskottets variabla längd och tre ytterligare mätvariabler (företrädesvis total skottlängd, färskvikt, torrsvikt eller antalet kransar). Mätningarna görs i början och slutet av testet. För färskvikt eller torrsvikt bestäms den initiala biomassan med hjälp av ett prov bestående av testorganismer från samma kultur som används för att ympa provkärlen. Beräkna ett medelvärde av den producerade mängden biomassa för varje testkoncentration och kontrollgrupp tillsammans med variansskattningar. Den genomsnittliga procentuella minskningen av den producerade mängden biomassa ($\% I_y$) beräknas för varje testgrupp med formeln

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

där

$\% I_y$ är den procentuella minskningen av den producerade mängden biomassa,

b_c är den slutliga biomassan minus den initiala biomassan för kontrollgruppen, och

b_T är den slutliga biomassan minus den initiala biomassan för testgruppen.

Fördubblingstid

54. Fördubblingstiden (T_d) för huvudskottets längd är ett giltighetskriterium (se punkt 8). Den bestäms genom att infoga data som insamlats från kontrollkärlen i följande formel:

$$T_d = \ln 2 / \mu$$

där μ är den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten enligt beskrivningen i punkterna 50–52.

Ritning av dos-respons-kurvor

55. Dos-respons-kurvor ska ritas som visar den genomsnittliga procentuella hämningen av responsvariabeln (I_r eller I_y) och logaritmen av testkemikaliens koncentration (I_r och I_y beräknas enligt avsnitt 53).

Bestämning av EC_x

56. Bestämningar av EC_x bör baseras både på genomsnittlig specifik tillväxthastighet ($E_r C_x$) och på producerad mängd biomassa ($E_y C_x$). De sistnämnda två responsvariablerna ska i sin tur bestämmas med hjälp av huvudskottets längd och eventuellt ytterligare mätvariabler (företrädesvis total skottlängd, färskvikt, torrsvikt eller antalet kransar). Detta beror på att det finns kemikalier vars inverkan på huvudskottets längd skiljer sig från deras inverkan på andra mätvariabler. Toxicitetsparametrarna bör därför vara fyra EC_x -värden för varje beräknad tillväxthämningsnivå x : $E_r C_x$ (huvudskottets längd), $E_r C_x$ (företrädesvis total skottlängd, färskvikt, torrsvikt eller antalet kransar), $E_y C_x$ (huvudskottets längd) och $E_y C_x$ (företrädesvis total skottlängd, färskvikt, torrsvikt eller antalet kransar).

57. Observera att EC_x -värden som beräknats utifrån de två responsvariablerna inte är jämförbara, och att denna skillnad framgår när man tillämpar testresultaten. EC_x -värden som grundar sig på den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten ($E_r C_x$) är oftast högre än de som grundar sig på den producerade mängden biomassa ($E_y C_x$) om de föreskrivna testbetingelserna i denna testmetod är uppfyllda, beroende på den matematiska grunden i respektive fall. Denna skillnad ska inte tolkas som en skillnad i känslighet mellan de två responsvariablerna, utan beror på att värdena är matematiskt olika.

Statistisk behandling

58. Målet är att bestämma det kvantitativa förhållandet mellan koncentration och respons med hjälp av regressionsanalys. Man kan använda viktad linjär regression efter att ha gjort en linjär transformation av responsdata, t.ex. med probit-, logit- eller Weibullvärden (7). Icke-linjära regressionsmetoder är dock att föredra, eftersom de är bättre anpassade för att hantera oönskade oregelbundenheter i data och avvikelser från jämna fördelningskurvor. I närheten av nollpunkten (ingen tillväxthämning) och fullständig tillväxthämning kan sådana oregelbundenheter bli felaktigt uppförstorade genom linjäriseringen och därigenom störa analysen (7). Observera att standardmetoder för analys med probit-, logit- eller Weibulltransformationer är avsedda för dikotoma data (dvs. tvåpunktsfördelade data, såsom dödlighet-överlevnad) och därför måste modifieras för att kunna användas för data rörande tillväxthastighet eller producerad mängd biomassa. Speciella metoder för bestämning av EC_x -värden ur kontinuerliga data återfinns i (8), (9) och (10).
59. För varje analyserad responsvariabel används förhållandet mellan koncentration och respons för att göra punktskattningar av EC_x -värden. Om möjligt ska 95-procentiga konfidensgränser bestämmas för varje skattning. Anpassningsgraden ("goodness of fit") mellan responsdata och regressionsmodellen ska bestämmas antingen grafiskt eller statistiskt. Regressionsanalysen ska göras på responsvärden från enskilda replikat, inte på medelvärden från testgrupper.
60. När tillgängliga regressionsmodeller eller regressionsmetoder inte lämpar sig för de aktuella dataserierna kan skattningar av EC_{50} -värden och konfidensgränser också bestämmas genom linjär interpolation och bootstrapping (10).
61. För skattning av LOEC (och därmed även av NOEC) jämförs medelvärden från testlösningarna med hjälp av variansanalysmetoder (ANOVA). Medelvärdet för varje koncentration jämförs sedan med medelvärdet för kontrollerna med hjälp av en lämplig metod för multipeljämförelse eller trendtest, t.ex. Dunnetts eller Williams test (12) (13) (14) (15) (16). Man måste avgöra om antagandet för ANOVA om variansens homogenitet är uppfyllt. Detta kan göras grafiskt eller med ett etablerat test (15), t.ex. Levenes eller Bartletts test. Skulle antagandet om variansens homogenitet inte vara uppfyllt kan man ibland korrigera för detta genom logaritmisk transformation av data. Om heterogeniteten i variansen är extremt stor och inte kan korrigeras genom transformation, ska man överväga att göra analysen med t.ex. Jonkheeres trendtester av "step-down"-typ. Mer information om bestämning av NOEC finns i (10).
62. Nya forskningsrön har lett till att man avråder från användning av NOEC-värden. I stället rekommenderas att man använder punktskattningar av EC_x baserade på regressionsanalys. För detta *Myriophyllum*-test har ännu inget passande värde på x fastställts. Ett intervall på 10–20 % förefaller dock vara lämpligt, beroende på vilken responsvariabel som används. Både EC_{10} och EC_{20} och deras konfidensgränser bör redovisas.

Rapportering

63. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie

Monokomponentämne:

— fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,

— kemiska beteckningar, såsom IUPAC- eller CAS-beteckning, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturformel, renhet, kemisk beteckning på föreningar i förekommande fall och om möjligt, osv. (inklusive organisk kolhalt i förekommande fall),

Multikomponentämne, UVCB-ämne eller blandning:

- karakteriseras så långt som möjligt genom kemisk beteckning (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.

Testarter.

- Vetenskaplig beteckning och källa.

Testbetingelser

- Använt testförfarande (statistiskt eller semistatistiskt).
- Startdatum och tid för testets genomförande.
- Testmedium.
- Beskrivning av testupplägget: provkärl och lock, lösningsvolym och huvudskottets längd per provkärl vid testets början.
- Testkoncentrationer (nominella respektive uppmätta värden) och antal replikat per koncentration.
- Metoder för beredning av stam- och testlösningar, med uppgift om användning av lösnings- eller dispergeringsmedel.
- Temperatur under testets gång.
- Ljuskälla, ljusintensitet och ljushomogenitet.
- pH-värden i test- och kontrollmedier.
- Analysmetod för testkemikalien med relevanta uppgifter för kvalitetsbedömning (kontroll av testresultatens giltighet, standardavvikelser eller konfidensgränser för analyserna).
- Metoder för bestämning av huvudskottets längd och andra mätvariabler, t.ex. total längd för sidogrenar, total skottlängd, total rotlängd, färskvikt, torrsvikt eller antal kransar.
- Kulturens tillstånd (steril eller icke-steril) i varje test- och kontrollkärl vid varje observation.
- Alla avvikelser från denna testmetod.

Resultat

- Rådata: huvudskottets längd och andra mätvariabler i alla test- och kontrollprov vid respektive observation och analystillfälle.
- Medelvärden och standardavvikelser för respektive mätvariabel.
- Tillväxtkurvor för varje mätvariabel.
- Beräknade responsvariabler för respektive testreplikat, inklusive medelvärden och variationskoefficient för replikaten.
- Diagram över förhållandet mellan koncentration och tillväxthämmande effekt.
- Uppskattningar av toxiska endpoints för responsvariablerna, t.ex. EC_{50} , EC_{10} och EC_{20} samt dithörande konfidensintervall. Om man räknat fram LOEC- och/eller NOEC-värden ska dessa anges, liksom de statistiska metoder som använts vid beräkningen.
- Om ANOVA-metoder har använts: storleken på observerad effekt (t.ex. minsta signifikanta skillnad).
- Eventuell tillväxtstimulans som har konstaterats i testlösningarna.
- Synliga tecken på fytotoxicitet samt observationer avseende testlösningarna.
- Diskussion av resultaten, inbegripet eventuell inverkan på testresultatet som kan tillskrivas avvikelser från denna testmetod.

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. m.fl. (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch*, nr 22, s. 702–710.
 - (3) Kapitel C.26 i denna bilaga: Bestämning av tillväxthämning hos Lemna-arter (andmat).
 - (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, nr 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, nr 23, OECD Publishing, Paris.
 - (6) Kapitel C.51 i denna bilaga: Toxicitetstest med vatten-sediment på *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. m.fl. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 11/2, s. 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, s. 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, nr 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, s. 1096–1121.
 - (13) Dunnett, C. W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, vol. 20/3, s. 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, s. 103–117.
 - (15) Williams, D. A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, vol. 28/2, s. 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, s. 93–96.
-

Tillägg 1

DEFINITIONER

Biomassa: färskvikt och/eller torrsvikt av levande materia i en population. I detta test är biomassan summan av huvudskottet, alla sidogrenar och alla rötter.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Kloros: förändring hos testorganismens färg, från grön till guldfärgad, särskilt på kransarna.

EC_x: den koncentration av testkemikalien upplöst i vatten som inom en fastställd exponeringsperiod leder till en minskning på x % (t.ex. 50 %) av tillväxten hos *Myriophyllum spicatum* (omnämns uttryckligen vid avvikelser från fullständig eller normal testperiod). För att entydigt ange om EC-värdet bygger på tillväxthastighet eller producerad mängd biomassa används beteckningen E_rC för tillväxthastighet och E_yC för producerad mängd biomassa, åtföljt av mätvariabeln, t.ex. E_rC (huvudskottets längd).

Tillväxt: en ökning av mätvariabeln under testperioden, t.ex. huvudskottets längd, total längd för sidogrenar, total skottlängd, total rotlängd, färskvikt, torrsvikt eller antal kransar.

Tillväxttakt (genomsnittlig specifik tillväxthastighet): logaritmisk ökning av mätvariabeln under exponeringstiden.
Anmärkning: Responsvariabler som är relaterade till tillväxttakten är inte beroende av testets varaktighet så länge tillväxtmönstret för oexponerade kontrollmekanismer är exponentiellt.

Lägsta koncentration med observerad effekt (LOEC – "Lowest Observed Effect Concentration"): den lägsta testade koncentration vid vilken man kan fastställa att testkemikalien har en statistiskt signifikant hämmande effekt på tillväxten (vid $p < 0,05$) inom en given exponeringstid, jämfört med kontrollen. Alla testkoncentrationer ovanför LOEC bör ha skadliga verkningar som är lika stora som eller större än de verkningar som observeras vid LOEC. Om dessa två villkor inte är uppfyllda bör en fullständig förklaring ges till hur man har valt LOEC (och därmed NOEC).

Mätvariabler: alla slags variabler som mäts för att uttrycka testets endpoint med hjälp av en eller flera responsvariabler. I denna testmetod är mätvariablerna huvudskottets längd, total längd för sidogrenar, total skottlängd, total rotlängd, färskvikt, torrsvikt eller antal kransar.

Monokultur: kultur bestående av en enda art.

Nekros är död vävnad (dvs. vit eller mörkbrun) hos testorganismen.

Nolleffektkoncentration (NOEC – "No Observed Effect Concentration"): testkoncentrationen omedelbart under LOEC.

Responsvariabel: variabel för bestämning av toxicitet. Variabeln fås fram genom att olika beräkningsmetoder tillämpas på uppmätta parametrar för biomassa. I den aktuella metoden är tillväxthastighet och producerad mängd biomassa responsvariabler som beräknas med hjälp av mätvariabler såsom huvudskottets längd, total skottlängd, färskvikt, torrsvikt eller antal kransar.

Semistatiskt testförfarande (med regelbunden förnyelse av testlösning): test där testlösningen byts med bestämda intervall under testet.

Statiskt testförfarande: testmetod utan regelbunden förnyelse av testlösningen under testet.

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

Endpoint: den allmänna faktor som genom inverkan av en testkemikalie förändras jämfört med ett kontrollprov utan testkemikalie. I det aktuella testet är endpointen tillväxthämning, som kan uttryckas med olika responsvariabler baserade på en eller flera mätvariabler.

Testmedium: syntetiskt odlingsmedium i vilket testplantorna växer när de exponeras för testkemikalien. Testkemikalien är vanligen löst i testmediet.

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

Producerad mängd biomassa: värdet på en mätvariabel i slutet av exponeringstiden minus motsvarande värde i början av exponeringstiden. Anmärkning: Om tillväxtmönstret för oexponerade organismer är exponentiellt minskar responsvariabler som är baserade på producerad mängd biomassa under testets varaktighet.

Tillägg 2

MODIFIERAT ANDREWSMEDIUM FÖR STAMKULTUR OCH FÖRKULTUR.

Det modifierade Andrewsmedium som behövs för stamkulturen och förkulturen fås fram med fem separat beredda näringsstamlösningar med tillsats av 3 % sackaros.

Tabell 1

Sammansättning hos Andrews näringslösning: (ASTM-beteckning E 1913-1904)

Produktion av näringsstamlösningar			Produktion av näringslösning
Stamlösning	Kemikalie	Initial vikt per 1 000 ml	ml per 5 liter näringslösning
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 stamlösning 3.1 nedan		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	

Stamlösningar kan förvaras i kylskåp i sex månader (vid 5–10 °C). Endast stamlösning nr 5 har en reducerad hållbarhetstid (två månader).

Tabell 2

Produktion av stamlösning 3.1 för beredning av stamlösning 3

Kemikalie	Initial vikt 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

När stamlösning 3.1 har producerats (tabell 2) djupfrysas lösningen i portioner på cirka 11 ml (temperaturen får inte överstiga –18 °C). De djupfrysta portionerna har en hållbarhetstid på fem år.

För att producera stamlösning 3, tina upp stamlösning 3.1, häll 10 ml av den i en enliters mätkolv och tillsätt ultrarent vatten upp till kolvens markering.

För att få fram det modifierade Andrewsmediet, häll cirka 2 500 ml ultrarent vatten i en femliters mätkolv. När 50 ml av varje stamlösning har tillsatts, fyll 90 % av mätkolven med ultrarent vatten och ställ in pH på 5,8.

Tillsätt därefter 150 g upplöst sackaros (3 % per 5 l) och fyll mätkolven med ultrarent vatten upp till markeringen. Häll till sist näringslösningen i enliters Schottkolvar och autoklavera vid 121 °C i 20 minuter.

Den näringslösning som fås fram på detta sätt kan hållas steril i kylskåp vid (5–10 °C) i tre månader.

Modifierat Andrewsmedium för toxicitetstest utan sediment

Det tiofaldigt koncentrerade modifierade Andrewsmedium som krävs för att få fram testlösningarna bereds av de fem näringsstamlösningar som anges i tabellerna 1 och 2, med tillsats av 30 % sackaros. Häll cirka 100 ml ultrarent vatten i en enliters mätkolv. Tillsätt 100 ml av var och en av stamlösningarna, ställ in pH på 5,8. Tillsätt därefter 30 % upplöst sackaros (300 g per 1 000 l) och fyll mätkolven med ultrarent vatten upp till markeringen.

Häll till sist näringslösningen i halvliters Schottkolvar och autoklavera vid 121 °C i 20 minuter.

Den tiofaldigt koncentrerade modifierade näringslösning som fås fram på detta sätt kan hållas steril i kylskåp vid (5–10 °C) i tre månader.

Tillägg 3

BEHANDLING AV STAMKULTURER

I tillägg 3 beskrivs stamkulturen av *Myriophyllum spicatum* L.⁽¹⁾, en submers tvåhjärtbladig växt som hör till slingesläktet. Mellan juni och augusti sticker nästan omärkliga rosa-vita blommor upp ovanför vattenytan. Växterna är rotade i botten genom ett system av robusta jordstammar och förekommer på hela norra halvklotet i näringsrika, ej förorenade och kalkrika stillastående vatten med lerigt substrat. Axslinga föredrar sötvatten, men förekommer även i bräckt vatten.

För stamkulturer utan sediment under laboratorieförhållanden krävs sterila plantor. Sterila plantor kan erhållas från det toxikologiska laboratoriet vid tyska Umweltbundesamt (Tysklands federala miljöbyrå).

Alternativt kan testorganismer beredas av icke-sterila växter i enlighet med ASTM-beteckning E 1913-04. Se nedan – utdrag från ASTM Standard Guide – förfarande för odling av *Myriophyllum sibiricum* som hämtats från naturen:

”Om icke-sterila plantor som hämtas från naturen används som utgångspunkt, samla in rotskott från *M. sibiricum* under hösten. Placera rotskotten i ett 20-litersakvarium med 5 cm sterilt sediment som är täckt med kvartssand eller t.ex. av Turface® och 18 liter reagensvatten. Lufta akvariet och upprätthåll en temperatur på 15 °C och en fluensgrad på 200–300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ under 16 timmar per dag. Växtkulturen i akvariet kan bevaras som en reservväxtkälla om de sterila växtkulturerna förstörs genom mekaniska fel i odlingskammaren, förorening eller av andra orsaker. De växter som odlas i akvariet är inte sterila och sterila kulturer kan inte bevaras i kulturens odlingsystem. För att sterilisera kulturen avlägsnas växterna från akvariet och sköljs under rinnande avjonat vatten i cirka en halvtimme. Växterna desinficeras under aseptiska förhållanden i ett dragskåp med laminärt luftflöde under mindre än 20 minuter (tills den största delen av växtvävnaden har blekts och endast den växande spetsen fortfarande är grön) i en lösning av 3 % (w/v) natriumhypoklorit som innehåller 0,01 % av ett lämpligt ytaktivt medel. Skaka desinfektionsmedlet och växtmaterialet. Segment med flera knutar överförs till sterila odlingsrör innehållande 45 ml steriliserat modifierat Andrewsmedium och tillsluts med vanliga lock för kulturer. Endast ett växtsegment placeras i varje testkär. Laboratorieförseglingsfilm används för att se till att odlingskärlet är tillslutet. När en steril kultur har etablerats bör växtsegment som innehåller flera knutar överföras till nya testkär som innehåller färsk flytande näringsmedier varje tionde till tolfte dag. Genom odling på agarplattor ska det visas att växterna är sterila och förblir så i åtta veckor innan testningen inleds.”

Eftersom det modifierade Andrewsmediet innehåller sackaros (som stimulerar tillväxten av svampar och bakterier) måste allt material och alla lösningar framställas och odlingen ske under sterila förhållanden. Alla vätskor samt utrustning steriliseras före användning. Sterilisering sker genom varmluftsbehandling (210 °C) i fyra timmar eller autoklavering i 20 minuter vid 121 °C. Dessutom ska alla kolvar, tallrikar, skålar osv. och annan utrustning genomgå flambehandling på en steril arbetsbänk strax före användning.

Stamkulturer kan förvaras vid reducerad belysning och låg temperatur (50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 20 $\pm$ 2 °C) under lång tid utan att de behöver startas på nytt. Odlingsmediet för *Myriophyllum* bör vara samma som det som används i testen, men för stamkulturer kan andra näringsrika medier användas.

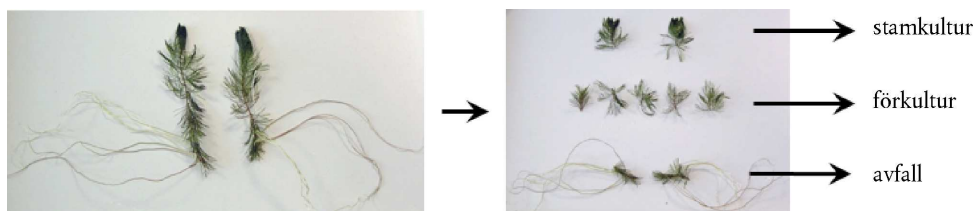
Växtsegmenten fördelas axeniskt mellan flera 500 ml Erlenmeyerkolvar och/eller 2 000 ml Fernbachkolvar. Varje kolv fylls med cirka 450 respektive 1 000 ml modifierat Andrewsmedium. Därefter försluts kolvarna axeniskt med cellulosaproppar.

Dessutom är en grundlig flambehandling av utrustningen vid en steril arbetsbänk precis före användning absolut nödvändig. Beroende på antal och storlek överförs växterna till en färsk näringslösning ungefär var tredje vecka.

Spetsar och segment av stammens mittdel kan användas för denna förnyade kultur. Antal och storlek på överförda växter (eller växtsegment) beror på hur många växter som behövs. Man kan t.ex. överföra fem skottsegment till en Fernbachkolv och tre skottsegment till en Erlenmeyerkolv, var och en med en längd på 5 cm. Rotade, blommande, döda eller på annat sätt iögonenfallande delar kasseras.

⁽¹⁾ Carl von Linné (* 23 maj 1707 i Råshult/Älmhult, † 10 januari 1778 i Uppsala).

Figur 1

Klippning av plantor för stam- och förkulturen efter tre veckors odling.

Växterna odlas i 500 ml Erlenmeyerkolvar och 2 000 ml Fernbachkolvar i en kylkubator vid 20 ± 2 °C med kontinuerligt ljus vid ungefär $100\text{--}150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ eller 6 000–9 000 lux (testkärlets belysning med "varmt vitt ljus").

Figur 2

Växtodling i en kylkubator med belysning av testkärnen.

Använd kemiskt rena (syratvättade) och sterila odlingskärl av glas. Hanteringen ska ske med aseptiska metoder. Om stamkulturen förorenas av t.ex. alger, svamp och/eller bakterier bör man bereda en ny kultur eller använda en stamkultur från ett annat laboratorium för att ersätta den förorenade kulturen.

Tillägg 4

UNDERHÅLL AV FÖRKULTUR OCH BEREDNING AV TESTORGANISMEN FÖR TESTET

För att få fram en förkultur klipper man skott från stamkulturen i segment med två kransar var. Segmenten placeras i Fernbachkolvar fyllda med modifierat Andrewsmedium (med 3 % sackaros). Varje kolv kan innehålla upp till 50 skottsegment. Det är dock viktigt att se till att segmenten är livskraftiga och inte har rötter, sidogrenar eller knoppar (se figur 1 i tillägg 3).

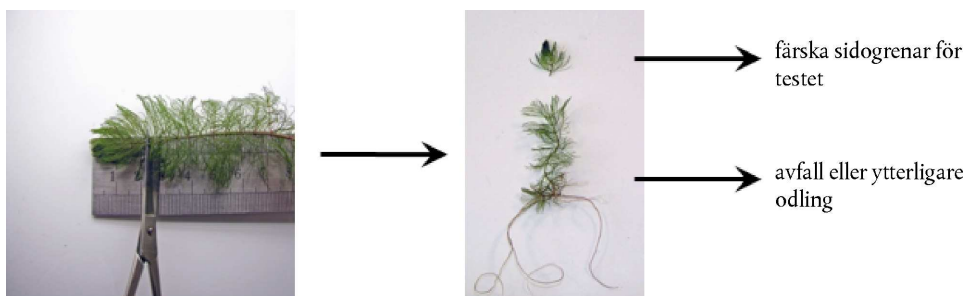
Förkulturens organismer odlas under 14 till 21 dagar under sterila förhållanden i klimatodlingskammare med omväxlande 16-/8-timmars ljus-/mörkerfaser. Ljusintensiteten väljs från intervallet $100\text{--}150\ \mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. Temperaturen i testkärnen bör vara $23 \pm 2\ ^\circ\text{C}$.

Eftersom det modifierade Andrewsmediet innehåller sackaros (som stimulerar tillväxten av alger, svampar och bakterier) bör testkemikalielösningarna beredas och odlingen ske under sterila förhållanden. Alla vätskor samt utrustning steriliseras före användning. Sterilisering sker via varmluftsbehandling ($210\ ^\circ\text{C}$) under fyra timmar eller autoklavering under 20 minuter vid $121\ ^\circ\text{C}$. Dessutom ska alla kolvar, tallrikar, skålar osv. och annan utrustning genomgå flambehandling på en steril arbetsbänk strax före användning.

Skotten avlägsnas axeniskt från förkulturkolvorna. Välj så homogent material som möjligt. Varje test kräver minst 60 testorganismer (testning sker med åtta koncentrationer av testkemikalien). För testningen tas färsk sidogrenar från förkulturerna. Korta av dem till 2,5 cm från basen (mätt med linjal) och överför dem till en bägare med sterilt modifierat Andrewsmedium. De färsk sidogrenarna kan användas för toxicitetstest på *Myriophyllum spicatum* utan sediment.

Figur 2:

Klippning av plantor från förkulturen för toxicitetstest på *Myriophyllum spicatum* utan sediment.



C.51 Toxicitetstest med vatten-sediment på *Myriophyllum spicatum*

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 239 (2014). Testmetoder finns för monokotyledona vattenlevande flytväxter, *Lemna*-arter (1) och algar (2). Dessa metoder används rutinmässigt för att generera data för att hantera risker med testkemikalier, särskilt kemikalier med ogräsbekämpande verkan, för vattenlevande växtarter som inte ska bekämpas. Men i vissa fall kan data för ytterligare makrofytarter krävas. Enligt den senaste vägledningen från SETAC:s (*Society of Environmental Toxicology and Chemistry*) workshop om AMRAP (*Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides*) kan data för rotade makrofytarter krävas för testkemikalier där man vet att *Lemna*-arter och alger inte är känsliga för verkningssättet eller om uppdelning i sediment är ett problem som leder till exponering via rötternas upptag (3). Baserat på nuvarande kunskap och erfarenhet valdes *Myriophyllum* spp. som föredragna arter i de fall där det krävs data för submersa rotade tvåhjärtbladiga arter (4) (5) (6). Detta test ersätter inte andra akvatiska toxicitetstester, utan bör snarare komplettera dessa tester för att möjliggöra en mer fullständig risk- och farobedömning av vattenväxter. Testmetoden Toxicitetstest med vatten-sediment på *Myriophyllum spicatum* kompletterar toxicitetstestet på *Myriophyllum spicatum* utan sediment (7).
2. Här beskrivs en testmetod som gör det möjligt att bedöma testkemikaliernas verkan på den rotade vattenväxten *Myriophyllum spicatum*, som växer i vatten-sedimentsystem. Testmetoden bygger dels på befintliga metoder (1) (2) (8) och tar hänsyn till den senaste forskningen om riskbedömning av vattenväxter (3). Metoden med vatten-sediment har validerats i en internationellt provningsjämförelse som genomfördes med *Myriophyllum*-arter. De odlades under statiska förhållanden och exponerades för testkemikalien genom tillsats direkt i vattnet (9). Testsystemet kan dock enkelt anpassas för att möjliggöra exponering via spikade sediment eller via vattenfasen i semistatiska metoder eller metoder med pulsdosering, även om dessa scenarier inte formellt har testats i en provningsjämförelse. Den allmänna metoden kan dessutom användas för andra rotade submersa och emersa arter, inklusive andra *Myriophyllum*-arter (t.ex. *Myriophyllum aquaticum*) och *Glyceria maxima* (10). Testbetingelser, utformning och varaktighet kan behöva ändras om alternativa arter används. Framför allt krävs mer arbete för att fastställa lämpliga förfaranden för *Myriophyllum aquaticum* (storslinga). Dessa alternativ presenteras inte i detalj i denna testmetod, som beskriver standardförfarandet för exponering av *Myriophyllum* i ett statiskt system via vattenfasen.
3. Denna testmetod gäller ämnen för vilka testmetoden har validerats (närmare uppgifter finns i rapporten från provningsjämförelsen (9)), beredningar eller kända blandningar. *Myriophyllum*-testet kan utföras för att uppfylla ett Tier-1 datakrav som uppstår till följd av att testkemikalien potentiellt övergår till sedimentet eller osäkerhet avseende verkningssätt/selektivitet. Ett laboratoriebaserat *Myriophyllum*-test kan likaså krävas som ett led i strategier med flera testnivåer för att hantera eventuella risker för vattenväxter. Orsaken till testet avgör exponeringsvägen (dvs. via vatten eller sediment). Innan denna testmetod används för lagstadgad testning av en blandning används bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag.

TESTPRINCIP

4. Testet är utformat för att bedöma kemikalierelaterade effekter på tillväxten hos *Myriophyllum*-växter som växer i standardiserade medier (vatten, sediment och näringsämnen). För detta ändamål planteras skottspetsar från friska ej blommande plantor i standardiserat konstgjort sediment, som kompletteras med ytterligare näringsämnen för att säkerställa en lämplig tillväxt. Därefter förvaras växterna i Smart- och Barko-medier (tillägg 1). Efter en etableringsperiod för att möjliggöra rotbildning exponeras växterna för en serie testkoncentrationer som tillsätts i vattenpelaren. Alternativt kan exponering via sedimentet simuleras genom att spika det artificiella sedimentet med testkemikalien och plantera om växterna i det spikade sedimentet. I båda fallen förvaras växterna därefter under kontrollerade miljöförhållanden i 14 dagar. Effekterna på tillväxten bestäms från kvantitativa bedömningar av skottets längd, färskvikt och torrsvikt, samt kvalitativa observationer av symptom som kloros, nekros eller missbildningar hos växten.

5. För att kvantifiera testkemikaliens effekter jämförs tillväxten i testlösningarna med kontrollväxternas tillväxt. Därefter bestäms den koncentration som orsakar en bestämd procent (x) av tillväxthämning. Denna koncentration betecknas som EC_x , där värdet "x" beror på vilka lagstadgade krav som gäller, t.ex. EC_{10} , EC_{20} och EC_{50} . Det bör noteras att uppskattningarna av värdena EC_{10} och EC_{20} endast är tillförlitliga och lämpliga för tester där kontrollväxternas variationskoefficienter faller under den uppskattade effektnivån, dvs. variationskoefficienterna bör vara < 20 % för en stabil uppskattning av ett EG_{20} -värde.
6. Både genomsnittlig specifik tillväxtgrad (uppskattas genom bedömningar av skottets längd samt färsk- och torrsvikt) och producerad mängd biomassa (uppskattas genom en beräkning av ökningen av skottets längd och av färsk- och torrsvikten) hos obehandlade och behandlade plantor bör bestämmas. Specifik/a tillväxtgrad/er (r) och utbyte (y) används sedan för att bestämma E_rC_x (t.ex. E_rC_{10} , E_rC_{20} , E_rC_{50}) respektive E_yC_x (t.ex. E_yC_{10} , E_yC_{20} , E_yC_{50}).
7. Vid behov kan den lägsta koncentrationen med observerad effekt (LOEC) och den högsta koncentrationen utan observerad effekt (NOEC) också bestämmas statistiskt genom beskattningar av genomsnittlig specifik tillväxttakt och producerad mängd biomassa.

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

8. Man bör ha tillgång till en analysmetod som är tillräckligt känslig för kvantitetsbestämning av testkemikalierna i testmediet.
9. Information om testkemikalien som kan vara användbar för att fastställa testbetingelserna inkluderar strukturformel, sammansättning när det gäller multikomponentämnen, UVCB-ämnen, blandningar eller beredningar, renhet, vattenlöslighet, stabilitet i vatten och ljus, syradissociationskonstant (pK_a), fördelningskoefficient oktanol/vatten (K_{ow}), K_d till sediment om det finns tillgängligt, ångtryck och biologisk nedbrytbarhet. Löslighet i vatten och ångtryck kan användas för att beräkna Henrys konstant, som visar om det är sannolikt att förlusterna av testkemikalien under tiden för testets genomförande kommer att vara betydande. Om förluster av testkemikalierna är sannolika bör de kvantifieras och de efterföljande stegen för att kontrollera sådana förluster bör dokumenteras. Om uppgifterna om testkemikaliens löslighet och stabilitet är osäkra bör man bedöma dessa egenskaper under testbetingelserna, dvs. i det odlingsmedium, vid den temperatur och under de belysningsförhållanden som används i testet. Obs: om ljusberoende peroxiderande växtbekämpningsmedel testas bör den laboratoriebelysning som används ha motsvarande ultraviolett ljus som förekommer i naturligt solljus.
10. pH-värdet bör mätas och justeras i förekommande fall. pH-kontrollen av testmediet är särskilt viktig, t.ex. när man testar metaller eller kemikalier som är hydrolytiskt instabila. Närmare vägledning för testning av kemikalier vars fysikalisk-kemiska egenskaper gör dem svåra att testa finns i OECD:s vägledningsdokument (11).

TESTETS GILTIGHET

11. För att testresultaten ska vara giltiga måste kontrollväxternas genomsnittliga totala skottlängd och färsksvikt åtminstone fördubblas under testets exponeringsfas. Dessutom får kontrollplantorna inte visa synliga symptom på kloros och bör vara fria från synliga föroreningar av andra organismer som alger och/eller bakteriebeläggningar på växterna, sedimentets yta och i testmediet.
12. Den genomsnittliga variationskoefficienten för producerad mängd biomassa (baserat på mätningar av skottens färsksvikt (dvs. från början till slutet av testet) i kontrollkulturerna får inte överskrida 35 % mellan replikaten.

REFERENSKEMIKALIE

13. Referenskemikalier, t.ex. 3,5-diklorfenol som används i provningsjämförelsen (9), bör regelbundet testas för att kontrollera resultatet av provningen över tiden. Enligt data från provningsjämförelsen ligger de genomsnittliga EC_{50} -värdena för 3,5-DCP för olika responsvariabler mellan 4,7 och 6,1 mg/l (se rapporten från provningsjämförelsen för information om förväntat konfidensintervall runt dessa värden). Det är lämpligt att testa en referenskemikalie minst två gånger per år eller, om testen utförs sällan, parallellt med de definitiva toxicitetstesterna. Vägledning om förväntade EC_{50} -värden för 3,5-DCP finns i dokumentet *Statistical Report of the International Ring-test* (9).

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Provningsutrustning

14. Testet bör utföras under kontrollerade miljöförhållanden, det vill säga i odlingskammare, odlingsrum eller i laboratorium, med kontrollerbar dygnslängd, belysning och temperatur (se avsnittet "Testbetingelser", punkterna 56–58). Stamkulturer bör förvaras separat från testkärlen.
15. Undersökningen bör genomföras med användning av glastestkärn som akvarier eller bägare. Vanligtvis används tvåliters glasbägare (de bör vara cirka 24 cm höga och 11 cm i diameter). Andra (dvs. större) kärn kan dock vara lämpliga, under förutsättning att vattendjupet är tillräckligt stort för att möjliggöra obegränsad tillväxt och växterna kan hållas nedsänkta under testperioden.
16. Plast- eller glaskrutor (cirka 9 cm i diameter, 8 cm höga och 500 ml volym) kan användas som behållare för att plantera växterna i sedimentet. Alternativt kan glasbägare användas och är att föredra i vissa fall (t.ex. vid testning av hydrofoba kemikalier eller kemikalier med hög K_{ow}).
17. Krukans/behållarens storlek måste övervägas i samband med valet av testkärn och testets utformning (se nedan). Om testutformning A (ett skott per kruka, tre krutor per kärn) tillämpas kan man behöva använda mindre krutor eller större kärn. Om testutformning B (tre skott per kruka, en kruka per kärn) används bör de angivna kruka- och kärnstorlekarna vara tillräckliga. I samtliga fall bör vattendjupet vara 12 cm över sedimentets topp. Förhållandet mellan sedimentets yta/volym och ytvattenarea/volym bör registreras.

Testorganism

18. De allmänna tillvägagångssätt som beskrivs i denna testmetod kan användas för att testa en rad olika vattenlevande växtarter. De förhållanden som anges i denna testmetod har dock skräddarsytt för att testa *Myriophyllum spicatum*, en vattenlevande art som hör till slingesläktet. Denna tvåhjärtbladiga art tillhör familjen Haloragaceae (slingeväxter).
19. *Myriophyllum spicatum* (axslinga) är en submers rotad vattenväxt som tål många olika förhållanden och växer i både statiska och strömmande vattenmassor. *M. spicatum* är perenn och endast rötterna är kvar under vintern. Vanligen blommar de och sätter frö fritt, men vegetativ fortplantning från axillära knoppar eller stamfragment som lossas naturligt eller vid störning är ofta den primära odlingsmetoden.

Odling av testorganismen

20. Växter kan erhållas från naturliga populationer eller via leverantörer av vattenlevande växter. I båda fallen bör växtkällan dokumenteras och arternas identitet bör kontrolleras. Om axslinga samlas in från naturen är det viktigt att mycket noggrant fastställa att rätt art samlas in, särskilt i regioner där den kan hybridisera med andra arter från slingesläktet. Vid osäkerhet rekommenderas användning av kontrollerade laboratoriekulturer från kända källor. Växter som har exponerats för kemiska föroreningar eller som samlats in från förorenade platser bör inte användas i detta test.
21. I regioner där *M. spicatum* är svår att få tag på under vintermånaderna kan långsiktig förvaring av stamkulturer vara nödvändigt, i växthus eller laboratorium. Stamkulturerna bör förvaras under förhållanden som liknar testförhållandena, men bestrålningen och temperaturen kan sänkas för att minska underhållsfrekvensen (t.ex. om inga *Myriophyllum*-tester är inplanerade under en tid). Användning av större akvarier och krutor än för testerna rekommenderas för att ge utrymme för spridning. Sedimentets och vattenmediets sammansättning bör vara densamma som för testerna, även om alternativa metoder för gödning av sedimentet kan användas (t.ex. kommersiella långtidsverkande gödselmedel).

22. Stamväxterna ska vara fria från synliga föroreningar av andra organismer, inklusive sniglar, fintrådiga alger, svampar och insekter, t.ex. ägg eller larver av vattenaloemott *Paraponyx stratiotata* och larver eller vuxna exemplar av viveln *Eubrychius velutus*. Växterna kan behöva sköljas i sötvatten för att eliminera synliga föroreningar. Dessutom bör utvecklingen av föroreningar från encelliga alger och bakterier minimeras, även om växtmaterialet inte måste vara fullständigt sterilt. Stamkulturerna bör övervakas och omplanteras vid behov för att undvika utveckling av föroreningar från alger och bakterier. Stamkulturerna kan luftas om alg- eller bakterieangreppen blir problematiska.
23. Växterna ska alltid odlas/acklimatiseras under förhållanden som liknar, men inte nödvändigtvis är identiska med, de förhållanden som används under testet under en lämplig period (dvs. > 2 veckor) innan de används i ett test.
24. Blommande stamkulturer bör inte användas i tester eftersom tillväxttakten i allmänhet minskar under och efter blomning.

Sediment

25. Följande syntetiska sediment, baserat på det syntetiska sediment som används i kapitel C.28 i denna bilaga (8), rekommenderas för detta test. Sedimentet framställs enligt beskrivningen i TM C.28, förutom tillsatsen av näringsämnen som beskrivs nedan:
- a) 4–5 % torv (torrvikt, enligt $2 \pm 0,5$ % organiskt kol, så nära pH 5,5–6,0 som möjligt). Det är viktigt att använda torv i pulverform, finmald (företrädesvis med en partikelstorlek ≤ 1 mm), och uteslutande lufttorkad,
 - b) 20 % (torrvikt) kaolinlera (kaolinithalt helst över 30 %),
 - c) 75–76 % (torrvikt) kvartssand (till största del bestående av fin sand där mer än 50 % av partiklarna har storleken 50–200 μm).
 - d) Ett vattenhaltigt näringsmedium tillsätts så att halten av både ammoniumklorid och natriumfosfat i den slutliga sedimentsatsen uppgår till 200 mg/kg torrt sediment och fukthalten i den slutliga blandningen håller sig inom ett intervall på 30 till 50 %.
 - e) Kemiskt rent kalciumkarbonat CaCO_3 tillsätts för att justera den slutliga sedimentblandningens pH till $7,0 \pm 0,5$.
26. Källan till torven, kaolinleran och sanden ska vara känd och dokumenterad. Om ursprunget är okänt eller inget betänkligheter bör de respektive sedimentkomponenterna kontrolleras med avseende på avsaknaden av kemiska föroreningar (t.ex. tungmetaller, organiska klorföreningar, organiska fosforföreningar).
27. De torra beståndsdelarna i sedimentet bör blandas så att de bildar en enhetlig massa innan den vattenbaserade näringslösningen blandas in ordentligt i sedimentet. Den fuktiga sedimentet bör beredas minst två dagar före användning så att torven blötläggs ordentligt och hydrofoba torvpartiklar inte flyter upp till ytan när sedimentet täcks med mediet. Före användning kan det fuktiga sedimentet förvaras i mörker.
28. När testet ska påbörjas överförs sedimentet till behållare av lämplig storlek, t.ex. krukor med en diameter som passar i glaskärnen (sedimentets ytareal bör täcka omkring 70 % eller mer av kärlets ytareal). Om behållaren har hål i botten bör en bit filterpapper placeras i botten så att sedimentet inte läcker ur behållaren. Krukorna fylls med sediment så att sedimentytan är plan. Därefter täcks det med ett tunt skikt ($\sim 2\text{--}3$ mm) av ett inert material, t.ex. sand, fint trädgårdsgrus (eller krossad korall), för att hålla sedimentet på plats.

Testmedium

29. Smart- och Barko-medier (12) rekommenderas för odling och testning av *Myriophyllum spicatum*. Beredningen av detta medium beskrivs i tillägg 1. Mediets pH-värde (vattenfasen) när testet inleds bör vara mellan 7,5 och 8,0 för optimal tillväxt.

Testets utformning

30. Testet bör omfatta minst sex likadana testkärn för den obehandlade kontrollen och minst fyra likadana testkärn för var och en av minst fem koncentrationsnivåer.
31. Om NOEC inte behöver bestämmas kan man ändra testupplägget så att antalet koncentrationer ökas medan antalet replikat per koncentration minskas.
32. Varje testkärn representerar ett replikat som innehåller tre skott. Det finns två alternativ för att odla tre skott i varje testkärn:
 - Testutformning A: ett skott per kruka och tre krukor per kärn.
 - Testutformning B: tre skott per kruka och en kruka per kärn.
 - Alternativa testutformningar med ett skott per kruka per testkärn är godtagbara under förutsättning att replikeringen justeras vid behov för att uppfylla erforderliga giltighetskriterier.
33. Provkärnen bör fördelas slumpmässigt mellan behandlingsgrupperna. Provkärnen måste placeras slumpmässigt i testområdet för att minimera inflytandet av rumsbetingade skillnader i ljusintensitet och temperatur.

Testkemikaliekoncentrationer och kontrollgrupper

34. Koncentrationerna bör normalt följa en geometrisk serie, separationsfaktorn mellan testkoncentrationerna bör inte överstiga 3,2. Förkunskap om testkemikalins toxicitet från ett preliminärt test underlättar valet av lämpliga testkoncentrationer.
35. För att bestämma en EC_x -koncentration ska EC_x ligga innanför intervallet för testkoncentrationerna för att man ska uppnå en lämplig konfidensgrad. Om man t.ex. ska bestämma EC_{50} ska den högsta testkoncentrationen vara högre än värdet på EC_{50} . Om värdet på EC_{50} ligger utanför intervallet för testkoncentrationerna blir motsvarande konfidensintervall stora, och det kan då bli omöjligt att korrekt bedöma modellens statistiska lämplighet. Användningen av fler testkoncentrationer förbättrar konfidensintervallet runt det resulterande EG_x -värdet.
36. För att bestämma LOEC/NOEC (valfri endpoint), bör den lägsta testkoncentrationen vara tillräckligt låg så att tillväxten inte signifikant skiljer sig från kontrollväxternas tillväxt. Den högsta testkoncentrationen ska vara tillräckligt hög så att tillväxten är märkbart lägre än i kontrollen. Användning av flera replikat ökar den statistiska styrkan för NOEC/ANOVA-utformningar.

Limit-test

37. Under vissa omständigheter, t.ex. när ett preliminärt test tyder på att testkemikalien inte har några toxiska effekter vid koncentrationer upp till 100 mg/l eller upp till dess löslighetsgräns i testmediet (om denna är lägre), kan man utföra ett limit-test. Man jämför då responsen mellan en kontrollgrupp och en behandlingsgrupp, med en koncentration på 100 mg/l eller en koncentration som motsvarar löslighetsgränsen eller 1 000 mg/kg torrt sediment. Detta test bör utföras enligt de allmänna principerna för ett vanligt dos-responstest. En ökning av det minsta antalet replikat till sex provkärn per kontroll och koncentration rekommenderas dock. Tillväxten i kontrollgruppen och testgruppen kan analyseras med en statistisk metod för jämförelse av medelvärden, t.ex. t-test (Students t-test).

Testlösningar

38. Testlösningarna bereds vanligtvis genom utspädning av en stamlösning som bereds genom upplösning eller dispergering av testkemikalien i Smart- och Barko-medier med hjälp av demineraliserat (dvs. destillerat eller avjonat) vatten (se tillägg 1).

39. Den högsta testkoncentrationen bör normalt inte överstiga testkemikaliens vattenlöslighet eller, när det gäller beredningar, dispergeringsgränsen enligt testbetingelserna.
40. För testkemikalier med låg vattenlöslighet kan det vara nödvändigt att bereda en koncentrerad stamlösning eller en dispersion med hjälp av ett organiskt lösningsmedel eller dispergeringsmedel för att underlätta tillsatsen av exakta mängder testkemikalie i testmediet och bidra till dispergeringen och upplösningen av kemikalien. Man bör därför så långt som möjligt undvika att använda sådana lösningsmedel eller dispergeringsmedel. Det får inte uppstå fytotoxicitet på grund av att man tvingas använda lösnings- eller dispergeringsmedel för att bereda testlösningen. Exempel på vanliga lösningsmedel som inte förorsakar fytotoxicitet vid koncentrationer upp till 100 µl/l är aceton och dimetylformamid. Om lösningsmedel eller dispergeringsmedel används bör deras slutkoncentrationer redovisas och begränsas till ett minimum (≤ 100 µl/l). Under sådana omständigheter bör alla behandlingar och kontroller (lösningsmedel) innehålla samma koncentration av lösningsmedel eller dispergeringsmedel. Obehandlade kontrollreplikater som inte innehåller lösningsmedel eller dispergeringsmedel tas också med i testutformningen. Ytterligare vägledning om användningen av dispergeringsmedel finns i ett av OECD:s vägledningsdokument (11).

TESTFÖRFARANDE

41. Testförfarandet varierar beroende på hur testkemikalien tillsätts (dvs. via vatten- eller sedimentfasen). Testkemikaliens sannolika beteende i vatten-sedimentsystemet bör övervägas som underlag för valet av exponeringssystem i testet (dvs. statisk exponering eller statisk förnyelse, spikat vatten eller spikat sediment). I vissa fall kan spetsade sedimenttester vara att föredra för kemikalier som förväntas fördelas till sediment i avsevärd utsträckning.

Etableringsfas

42. Friska skottspetsar/toppar, dvs. utan sidoskott, klipps av från odlingsväxterna för att få en skottlängd på 6 cm (± 1 cm). För testutformning A (ett skott per kruka och tre krukor per kärl) planteras enskilda skottoppar i varje kruka. För testutformning B (tre skott per kruka och en kruka per kärl) planteras fyra till fem skottspetsar i varje kruka med sediment.
43. I båda fallen bör extra krukor planteras så att ett urval av enhetliga växter kan väljas ut när testet inleds. De kan dessutom användas som reservväxter för att kontrollera rotväxten omedelbart före behandling och växterna kan sköras för mätningar av skottens biomassa och längd på dag 0.
44. Skotten planteras så att omkring 3 cm av skottet och minst två knutar finns under sedimentytan.
45. Krukorna överförs sedan till testkärlen under samma miljöförhållanden som under exponeringsfasen och förvaras i sju dagar i Smart- och Barko-medium för att framkalla rotutveckling.
46. Efter denna tid bör flera växter i reservkrukorna avlägsnas för kontroll av rotväxten. Om rotväxten inte är synlig (dvs. rotspetsar är inte synliga) bör etableringsfasen förlängas tills rotväxten är synlig. Detta steg rekommenderas för att säkerställa att plantorna växer aktivt vid den tidpunkt då testet inleds.

Val av enhetligt växtmaterial

47. För testutformning A (ett skott per kruka och tre krukor per kärl) väljs enhetliga krukor ut innan testet inleds. För testutformning B (tre skott per kruka och en kruka per kärl) avlägsnas överskottsplanter så att tre plantor som är enhetliga i storlek och utseende finns kvar.

Exponering via vattenfasen

48. De krukor som valts ut för enhetlighet placeras i testkärnen enligt testutformningen. Smart- och Barko-medier tillsätts sedan till testkärnen. Var noga med att undvika störningar för sedimentet. För att undvika störningar kan mediet tillsättas hjälp av en tratt eller en plastskiva för att täcka sedimentet medan mediet hålls i testkärnen. Skivan måste dock avlägsnas omedelbart efteråt. Alternativt kan krukorna placeras i testkärnen efter det att mediet tillsatts. I båda fallen kan färskt medium användas i början av exponeringsfasen om det är nödvändigt för att minimera eventuell uppkomst av alger och bakterier eller för att möjliggöra beredning av enstaka testlösningssatser i replikaten.
49. Skottens längd över sedimentet mäts, antingen före eller efter tillsatsen av mediet.
50. Relevanta mängder av testkemikalien kan tillsättas testmediet innan de tillsätts testkärnen. Alternativt kan testkemikalien införas i mediet efter det att det har tillsatts testkärnen. I detta fall är det viktigt att säkerställa att testkemikalien fördelas homogent i hela testsystemet utan att störa sedimentet.
51. I samtliga registreras testmediets utseende (t.ex. klart, grumligt osv.) när testet inleds.

Exponering via sediment

52. Spikat sediment med vald koncentration bereds genom tillsättning av en lösning av testkemikalien direkt i nytt sediment. En stamlösning av testkemikalien upplöst i avjonat vatten blandas med det syntetiska sedimentet i en valskvarn, matningsblandare eller manuellt. Om den är svårslöslig i vatten kan testkemikalien lösas upp i minsta möjliga volym lämpligt organiskt lösningsmedel (t.ex. hexan, aceton eller kloroform). Denna lösning blandas sedan med cirka 10 g fin kvartssand för ett testkärl. Lösningssmedlet får avdunsta och därefter blandas sanden med lämplig mängd sediment per testbägare. Endast ämnen som avdunstar lätt får användas för att upplösa, dispergera eller emulgera testkemikalien. Man bör hålla i åtanke att volymen/vikten för den sand som spikas med testkemikalien måste beaktas när sedimentet bereds (dvs. sedimentet bör beredas med en mindre mängd sand). Man bör vara noga med att se till att testkemikalien som tillsätts sedimentet fördelas omsorgsfullt och jämnt i sedimentet.
53. Det spikade sedimentet fylls i krukorna (enligt beskrivningen ovan). Växter som valts ut för enhetlighet och har ett lämpligt rotsystem avlägsnas från de krukor som används under etableringsfasen och planteras om i det spikade sediment som beskrivs ovan.
54. Krukorna placeras i testkärnen enligt testutformningen. Smart- och Barko-medier tillsätts sedan försiktigt (med användning av en tratt), för att undvika störningar i sedimentet. Skottens längd över sedimentet mäts, antingen före eller efter tillsatsen av mediet.

Upprätthållande av vattennivåer under testperioden

55. Den slutliga vattenvolymen ska registreras och vattennivån markeras på varje testkärl. Om vatten avdunstar med mer än 10 % under testet bör vattennivån justeras med destillerat vatten. Vid behov kan bägarna täckas löst med genomskinliga lock, t.ex. genomskinliga plastlock, för att minimera avdunstning och föroreningar från algsporer.

Testbetingelser

56. Lysrörsbelysning med varmt eller kallt vitt ljus används för att åstadkomma en ljusstrålning i ett intervall på ungefär 140 (± 20) $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, varvid intensiteten mäts inom ett fotosyntetiskt aktivt våglängdsområde (400–700 nm) vid vattenytan. Ljus-mörkerperioden ska vara 16:8 timmar. Ljusstrålningen får inte variera mer än ± 15 % över testytan.

57. Temperaturen i testkärnen ska vara 20 ± 2 °C.
58. Kontrollmediets pH får inte öka med mer än 1,5 enheter under testet. En avvikelse på mer än 1,5 gör dock inte testresultaten ogiltiga om det kan visas att de tidigare angivna kriterierna för testresultatens giltighet är uppfyllda.

Testets varaktighet

59. Exponeringsperioden är 14 dagar.

Mätningar och analytiska bestämningar

60. Efter etableringsfasen och omedelbart före behandling (dvs på dag 0) skördas reservväxter från fem slumpvis utvalda krukor för testutformningen med tre växter per kruka eller 15 krukor för testutformningen med en växt per kruka. Därefter utförs bedömningen av skottens längd samt färsk- och torrvt enligt beskrivningen ovan.
61. När det gäller växter som överförs till exponeringsfasen görs följande bedömningar enligt tabell 1:
- Bedömningar av huvudskottets längd och antalet sidoskott och deras längd registreras åtminstone i slutet av exponeringsperioden (t.ex. på dag 14).
 - Visuella bedömningar av växternas hälsa registreras åtminstone tre gånger under exponeringstiden (t.ex. dagarna 0, 7 och 14).
 - Bedömningar av skottens färsk- och torrvt görs i slutet av testet (dvs. på dag 14).
62. Skottlängden bestäms med hjälp av en linjal. Om det finns sidoskott registreras antalet och även deras längd mäts.
63. Visuella bedömningar av växternas hälsa görs genom att växternas utseende och testmediets allmänna tillstånd registreras. Följande iakttagelser bör noteras:
- Nekros, kloros eller annan missfärgning, såsom överdriven rödfärgning jämfört med kontrollväxterna.
 - Utveckling av kontaminering från bakterier eller alger.
 - Tillväxtstörningar, såsom dvärgväxt, förändrad internodlängd, förvridna skott/blad, spridning av sidoskott, tappade blad, förlorad turgor och splittring av stammen.
 - Visuella bedömningar av rötternas tillstånd görs i slutet av testet. Segmentet tvättas försiktigt bort från rötterna så att rotsystemet kan observeras. Nedan visas en föreslagen bedömningsskala i förhållande till kontrollväxterna:
 - 1) inga rötter
 - 2) få rötter
 - 3) måttlig rotutveckling
 - 4) mycket bra rotutveckling, jämförbar med kontroller
64. Bedömningar av färskvikten görs i början och slutet av testet. Skottet skärs av vid sedimentnivå och klappas torrt före vägning. Det är viktigt att avlägsna sedimentpartiklar som kan ha fastnat på skottets bas. Skottmaterialet placeras sedan i en torkugn vid cirka 60 °C och torkas till konstant vikt, före omvägning och registrering av torrvikten.
65. En sammanfattning av de biologiska bedömningar som minst krävs under testperioden ges i tabell 1.

Tabell 1

Bedömningschema

Dag efter behandling (DEB)	<i>Myriophyllum spicatum</i>			
	Skottlängd, sidoskottens längd och antal	Visuell bedömning av skotten	Skottens färsk- och torrsvikt Visuell bedömning av rötter	pH-värde O ₂
0	A	A	A	A
4	—	—	—	—
7	—	A	—	A
14	A	A	A	A

A: anger att bedömningar krävs vid dessa tillfällen.

—: anger att mätningar inte krävs.

Mätfrekvens och analytiska bestämmningar

66. Temperaturen hos mediet i ett kompletterande kärl med enbart testmedium som hålls under samma betingelser i odlingskammaren, inkubatorn eller klimatrumsrummet ska registreras minst en gång per dag.
67. Testmediets pH och koncentration av upplöst syre bör kontrolleras för alla replikatkärl åtminstone när testet inleds, minst en gång under testet och i slutet av testet. Mätningarna bör alltid utföras vid samma tid på dagen. Om bulklösningar används för att bereda alla replikat för varje testkoncentration, är en enda mätning av varje bulklösning är godtagbar på dag 0.
68. Strålningen bör mätas i odlingskammaren, inkubatorn eller klimatrumsrummet vid punkter som motsvarar vattenytans nivå. Mätningar bör göras minst en gång i början eller under testet. Metoden för detektering och mätning av ljuset, framför allt typen av ljussensor, påverkar mätvärdet. Sfäriska sensorer – som mäter ljuset från alla vinklar ovanför och under mätplanet – och sensorer av solsensortyp (med cosinuskoefficient för infallsvinkeln) – som mäter ljuset från alla vinklar ovanför mätplanet – är att föredra framför riktade sensorer. De förstnämnda sensorerna ger större mätutslag för en diffus ljuskälla av den typ som beskrivits här.

Analytiska mätningar av testkemikalien

69. Analytiska mätningar av testkemikalien bör göras för att säkerställa att testkemikaliekoncentrationerna appliceras korrekt.
70. Vattenprover bör samlas in för analysen av testkemikalien strax innan testet inleds (dvs. samma dag som de stabila testkemikalierna appliceras eller en timme efter appliceringen för kemikalier som inte är stabila) och i slutet av testet för alla testkoncentrationer.
71. Koncentrationerna i sedimentet och sedimentets porvatten bör bestämmas i början och slutet av testet, åtminstone i den högsta testkoncentrationen, om inte testkemikalierna är kända för att vara stabila i vatten (> 80 % av det nominella värdet). Mätningar i sedimentet och porvattnet är eventuellt inte nödvändiga om fördelningen av testkemikalien mellan vatten och sediment har bestämts noggrant under motsvarande betingelser (t.ex. förhållandet mellan sediment och vatten, applicering och sedimenttyp).

72. Provtagning av sedimentet när testet inleds kommer sannolikt att störa testsystemet. Därför kan ytterligare behandlade testkärl krävas för att underlätta analytiska bestämningar i början och slutet av testet. Om mellanliggande bedömningar anses vara nödvändiga, dvs. på dag 7, och analyserna kräver stora sedimentprover som är svåra att avlägsna från testsystemet bör de analytiska bestämningarna göras med hjälp av ytterligare testkärl som behandlas på samma sätt som de testkärl som används för biologiska bedömningar.
73. Centrifugering vid t.ex. 10 000 g och 4°C under 30 minuter rekommenderas för isolering av porvattnet. Om testkemikalien bevisligen inte absorberas på filter kan även filtrering godtas. I vissa fall är det kanske inte möjligt att analysera koncentrationerna i porvattnet om provet är för litet.
74. Vid semistatiska tester (dvs. exponering via vattenfasen) där koncentrationen av de relevanta testkemikalierna inte förväntas hålla sig inom 20 % av den nominella koncentrationen under testperioden utan förnyelse av testlösningar, bör använda och nyberedda testlösningar provtas för analyser av testkemikaliens koncentration vid varje förnyelse.
75. För test i vilka den uppmätta startkoncentrationen av testkemikalien inte ligger inom 20 % av den nominella koncentrationen men tillräckliga bevis kan framläggas för att visa att startkoncentrationerna är repeterbara och stabila (dvs. inom intervallet 80–120 % av startkoncentrationen), räcker det om kemiska bestämningar utförs enbart för de högsta och lägsta testkoncentrationerna.
76. Under alla omständigheter behöver bestämning av testkemikaliens koncentration bara göras för ett enda replikatkärl per testkoncentration. Alternativt kan testlösningarna i alla replikat för varje koncentration slås ihop för analyserna.
77. Om man kan visa att testkemikaliens koncentration har hållits inom 20 % av den nominella eller uppmätta startkoncentrationen genom hela testet kan analysen av resultaten och härledningen av endpoints baseras på nominella eller uppmätta startvärden.
78. I dessa fall bör effektkoncentrationerna baseras på nominella eller uppmätta vattenkoncentrationer i början av testet.
79. Om det finns belägg för att koncentrationen har minskat genom hela testet (dvs. inte upprätthålls inom 20 % av den nominella eller uppmätta startkoncentrationen i den behandlade kammaren), bör analysen av resultaten i stället baseras på koncentrationens geometriska medelvärde under exponeringen eller på modeller som beskriver minskningen av koncentrationen av den undersökta kemikalien i den behandlade kammaren (11).

UTVÄRDERING AV DATA

80. Om användning av lösningsmedel/dispergeringsmedel är nödvändig kan data från lösningsmedelskontroller och obehandlade kontroller slås ihop för de statistiska analyserna, under förutsättning att responserna från lösningsmedelskontrollerna och de obehandlade kontroller inte skiljer sig på ett statistiskt signifikant sätt.

Responsvariabler

81. Syftet med testet är att bestämma testkemikaliens effekter på den testade artens vegetativa tillväxt, med användning av två responsvariabler, genomsnittlig specifiktillväxttakt och producerad mängd biomassa, enligt följande:

Genomsnittlig specifik tillväxthastighet

82. Denna responsvariabel baseras på förändringar i logaritmerna för skottets totala längd samt färsk- och torrvtikt över tiden i kontrollerna och i varje behandlingsgrupp. Den beräknas för varje replikat i varje kontroll- och behandlingsgrupp. Genomsnittlig längd och vikt för de tre växterna per testkär (replikaten) och tillväxttakten för varje replikat bör beräknas med hjälp av följande formel:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

där

μ_{i-j} är genomsnittlig specifik tillväxthastighet från tidpunkten i till tidpunkten j,

N_i är värdet på mätvariabeln i prov- respektive kontrollkärlet vid tidpunkten i,

N_j är värdet på mätvariabeln i prov- respektive kontrollkärlet vid tidpunkten j, och

t är tidslängden mellan tidpunkterna i och j.

83. Från replikatens responser ska ett medelvärde för tillväxthastigheten liksom en uppskattning av variansen räknas fram för varje test- och kontrollgrupp.
84. Den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten ska beräknas för hela tiden för testets genomförande ("i" i formeln betecknar början av tiden för testets genomförande, och "j" slutet). Beräkna ett medelvärde av den genomsnittliga tillväxthastigheten för varje testkoncentration och kontrollgrupp tillsammans med variansskattningar.
85. Den procentuella tillväxthämningen (I_t) beräknas sedan för varje testkoncentration (testgrupp) med formeln

$$\%I_t = \frac{(\mu_c - \mu_t)}{\mu_c} \times 100$$

där

% I_t är den procentuella minskningen av den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten,

μ_c är medelvärdet av μ i kontrollgruppen, och

μ_t är medelvärdet av μ i testgruppen.

Producerad mängd biomassa

86. Denna responsvariabel baseras på förändringar av total längd, färskvikt och torrvtikt för skottet över tiden i kontrollerna och varje behandlingsgrupp. Den genomsnittliga procentuella minskningen av den producerade mängden biomassa (% I_y) beräknas för varje testgrupp med formeln

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_t)}{b_c}$$

där

% I_y är den procentuella minskningen av den producerade mängden biomassa,

b_c är den slutliga biomassan minus den initiala biomassan för kontrollgruppen, och

b_t är den slutliga biomassan minus den initiala biomassan för testgruppen.

Ritning av dos-respons-kurvor

87. Dos-respons-kurvor ska ritas som visar den genomsnittliga procentuella hämningen av responsvariabeln (I_r eller I_y) och logaritmen av testkemikalens koncentration (I_r och I_y beräknas enligt ovan).

Bestämning av EC_x

88. Bestämningar av EC_x (t.ex. EC_{50}) ska baseras både på genomsnittlig specifik tillväxthastighet ($E_r C_x$) och på producerad mängd biomassa ($E_y C_x$). Dessa responsvariabler ska i sin tur bestämmas med hjälp av total färskvikt, total torrsvikt och totallängd för skotten.
89. Observera att EC_x -värden som beräknats utifrån de två responsvariablerna inte är jämförbara, och att denna skillnad framgår när man tillämpar testresultaten. EC_x -värden som grundar sig på den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten ($E_r C_x$) är oftast högre än de som grundar sig på den producerade mängden biomassa ($E_y C_x$) om de föreskrivna testbetingelserna i denna testmetod är uppfyllda, beroende på den matematiska grunden i respektive fall. Denna skillnad ska inte tolkas som en skillnad i känslighet mellan de två responsvariablerna, utan beror på att värdena är matematiskt olika.

Statistisk behandling

90. Målet är att bestämma det kvantitativa förhållandet mellan koncentration och respons med hjälp av regressionsanalys. Man kan använda viktad linjär regression efter att ha gjort en linjär transformation av responsdata, t.ex. till probit-, logit- eller Weibullvärden (13). Icke-linjära regressionsmetoder är dock att föredra, eftersom de är bättre anpassade för att hantera oregelbundna oregelbundenheter i data och avvikelser från jämna fördelningskurvor. I närheten av nollpunkten (ingen tillväxthämning) och fullständig tillväxthämning kan sådana oregelbundenheter bli uppförstorade genom linjäriseringen och därigenom störa analysen (13). Observera att standardmetoder för analys med probit-, logit- eller Weibulltransformationer är avsedda för dikotoma data (dvs. tvåpunktsfördelade data, såsom dödlighet-överlevnad) och därför bör modifieras för att kunna användas för data rörande tillväxthastighet eller producerad mängd biomassa. Speciella metoder för bestämning av EC_x -värden ur kontinuerliga data återfinns i (14), (15), (16) och (17).
91. För varje analyserad responsvariabel används förhållandet mellan koncentration och respons för att göra punktskattningar av EC_x -värden. Konfidensgränserna på 95 % för varje uppskattning bestäms och anpassningsgraden ("goodness of fit") mellan responsdata och regressionsmodellen bör bestämmas antingen grafiskt eller statistiskt. Regressionsanalysen ska göras på responsvärden från enskilda replikat, inte på medelvärden från testgrupper.
92. När tillgängliga regressionsmodeller eller regressionsmetoder inte lämpar sig för de aktuella dataserierna kan skattningar av EC_{50} -värden och konfidensgränser också bestämmas genom linjär interpolation och bootstrapping (18).
93. För skattning av LOEC (och därmed även av NOEC) jämförs medelvärden från testlösningarna med hjälp av variansanalysmetoder (ANOVA). Medelvärdet för varje koncentration jämförs sedan med medelvärdet för kontrollerna med hjälp av en lämplig testmetod (t.ex. Dunnetts test, Williams test) (19) (20) (21) (22). Man måste avgöra om antagandet för ANOVA om normal distribution (ND) och variansens homogenitet (VH) är uppfyllt. Denna bedömning bör utföras med Shapiro-Wilks-testet (ND) eller Levene-testet (VH). Skulle antagandet om variansens homogenitet inte vara uppfyllt kan man ibland korrigera för detta genom logaritmisk transformation av data. Om variansens heterogenitet och/eller avvikelser från ND är extrem och inte kan korrigeras genom transformation, bör analys med metoder som Bonferroni-Welch-t-testet, Jonkheere Terpstra-testet av step-down-typ och Bonferroni-median-testet övervägas. Mer information om bestämning av NOEC finns i (16).

RAPPORTERING

94. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie

Monokomponentämne:

— fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,

- kemiska beteckningar, såsom IUPAC- eller CAS-beteckning, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturformel, renhet, kemisk beteckning på föreningar i förekommande fall och om möjligt osv.

Multikomponentämne, UVCB-ämne och blandning:

- karakteriseras så långt som möjligt genom kemisk beteckning (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.

testarter,

- vetenskaplig beteckning och källa,

testbetingelser,

- varaktighet och förhållanden under etableringsfasen,
- tillämpat testförfarande (statiskt, semistatiskt, pulserat),
- testets startdatum och varaktighet,
- testmedium, dvs. sediment och flytande näringsmedium,
- beskrivning av testets utformning: växtkammare/växtrum eller laboratorium, testkärl och lock, lösningsvolym, testplantornas längd och vikt per testkärl i början av testet, förhållandet mellan sedimentets yta och vattenytan, förhållande mellan sediment- och vattenvolym,
- testkoncentrationer (nominella respektive uppmätta värden) och antal replikat per koncentration,
- metoder för beredning av stam- och testlösningar, med uppgift om användning av lösnings- eller dispergeringsmedel,
- temperatur under testets gång,
- ljuskälla, bestrålning ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$),
- pH-värden hos test- och kontrollmedier samt testmediernas utseende vid testets början och slut,
- syrekoncentrationer,
- analysmetod med relevanta uppgifter för kvalitetsbedömning (kontroll av testresultatens giltighet, standardavvikelser eller konfidensgränser för analyserna),
- metoder för bestämning av mätvariabler, t.ex. längd, torrsvikt, färsksvikt,
- alla avvikelser från denna testmetod.

Resultat

- rådata: skottens längd och vikt per växter/kruka och andra mätvariabler i varje test- och kontrollkärl vid varje observation och analystillfälle enligt det bedömningsschema som anges i tabell 1,
- medelvärden och standardavvikelser för respektive mätvariabel,
- tillväxtkurvor för varje koncentration,
- dubblingstid/tillväxtgrad i kontrollen baserat på skottens längd och färsksvikt, inklusive variationskoefficienten för producerad mängd biomassa i färsksvikt,
- beräknade responsvariabler för respektive testreplik, inklusive medelvärden och variationskoefficient för replikaten,
- diagram över förhållandet mellan koncentration och tillväxthämmande effekt,
- uppskattningar av toxiska effektområden för responsvariabler t.ex. EG_{50} och tillhörande konfidensintervall. Om man räknat fram LOEC- och/eller NOEC-värden ska dessa anges, liksom de statistiska metoder som använts vid beräkningen,

- om ANOVA-metoder har använts: storleken på observerad effekt (t.ex. minsta signifikanta skillnad),
- eventuell tillväxtstimulans som har konstaterats i testlösningarna,
- synliga tecken på fytotoxicitet samt observationer avseende testlösningarna,
- diskussion av resultaten, inbegripet eventuell inverkan på testresultatet som kan tillskrivas avvikelser från denna testmetod.

LITTERATURHÄNVISNINGAR

- (1) Kapitel C.26 i denna bilaga: Bestämning av tillväxthämning hos *Lemna*-arter (andmat).
- (2) Kapitel C.3 i denna bilaga: Bestämning av tillväxthämning hos sötvattensalger och cyanobakterier
- (3) Maltby, L. m.fl. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), den 14–16 januari 2008.
- (4) Arts, G.H.P. m.fl. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, vol. 153, s. 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. m.fl. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, vol. 62/8, s. 715–722.
- (7) Kapitel C.50 i denna bilaga: Toxicitetstest utan sediment på *Myriophyllum spicatum*.
- (8) Kapitel C.28 i denna bilaga: Toxicitetstest i sediment- och vattenfas på chironomid-larver med spikat vatten.
- (9) Ratte, M., H. Ratte (2014), "Myriophyllum Akut 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, nr 206, OECD Publishing, Paris.
- (10) Davies, J. m.fl. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron – a case study, Pest Management Science, vol. 59/2, s. 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, nr 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, s. 251–263.
- (13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, vol. 18/9, s. 713–718.
- (14) Nyholm, N. m.fl. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 11/2, s. 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, nr 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, s. 1096–1121.
- (20) Dunnett, C. W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, vol. 20/3, s. 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, s. 103–117.
- (22) Williams, D. A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, vol. 28/2, s. 519–531.
-

Tillägg 1

SAMMANSÄTTNING HOS SMART- OCH BARKO-MEDIER

Komponent	Mängd reagens som tillsätts vattnet (*) (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 (jämviktsläge luft)	7,9

(*) Demineraliserat (dvs destillerat eller avjoniserat) vatten

Tillägg 2

DEFINITIONER

Biomassa: färskvikt och/eller torrsvikt av levande materia i en population. I detta test är biomassan summan av huvudskottet, alla sidogrenar och alla rötter.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Kloros: förändring hos testorganismens färg, från grön till guldfärgad, särskilt på kransarna.

Ec_x: den koncentration av testkemikalien upplöst i vatten som inom en fastställd exponeringsperiod leder till en minskning på x % (t.ex. 50 %) av tillväxten hos *Myriophyllum spicatum* inom en angiven exponeringsperiod (omnämns uttryckligen vid avvikelse från fullständig eller normal testperiod). För att entydigt ange om EC-värdet bygger på tillväxthastighet eller producerad mängd biomassa används beteckningen E_tC för tillväxthastighet och E_pC för producerad mängd biomassa, åtföljt av mätvariabeln, t.ex. E_tC (huvudskottets längd).

Tillväxt: en ökning av mätvariabeln under testperioden, t.ex. huvudskottets längd, total längd för sidogrenar, total skottlängd, total rotlängd, färskvikt, torrsvikt eller antal kransar.

Tillväxttakt: (genomsnittlig specifik tillväxthastighet) logaritmisk ökning av mätvariabeln under exponeringstiden. *Anmärkning:* Responsvariabler som är relaterade till tillväxttakten är inte beroende av testets varaktighet så länge tillväxtmönstret för oexponerade kontrollmekanismer är exponentiellt.

Lägsta koncentration med observerad effekt (LOEC – "Lowest Observed Effect Concentration"): den lägsta testade koncentration vid vilken man kan fastställa att testkemikalien har en statistiskt signifikant hämmande effekt på tillväxten (vid $p < 0,05$) inom en given exponeringstid, jämfört med kontrollen. Alla testkoncentrationer ovanför LOEC bör ha skadliga verkningar som är lika stora som eller större än de verkningar som observeras vid LOEC. Om dessa två villkor inte är uppfyllda bör en fullständig förklaring ges till hur man har valt LOEC (och därmed NOEC).

Mätvariabler: alla slags variabler som mäts för att uttrycka testets endpoint med hjälp av en eller flera responsvariabler. I denna testmetod är mätvariablerna huvudskottets längd, total längd för sidogrenar, total skottlängd, total rotlängd, färskvikt, torrsvikt eller antal kransar.

Monokultur: kultur bestående av en enda art.

Nekros: död vävnad (dvs. vit eller mörkbrun) hos testorganismen.

Nolleffektkoncentration (NOEC – "No Observed Effect Concentration"): testkoncentrationen omedelbart under LOEC.

Responsvariabel: variabel för bestämning av toxicitet. Variabeln fås fram genom att olika beräkningsmetoder tillämpas på uppmätta variabler för biomassa. I den aktuella metoden är tillväxthastighet och producerad mängd biomassa responsvariabler som beräknas med hjälp av mätvariabler såsom huvudskottets längd, total skottlängd, färskvikt, torrsvikt eller antal kransar.

Semistatiskt testförfarande (med regelbunden förnyelse av testlösning): test där testlösningen byts med bestämda intervall under testet.

Statiskt testförfarande: testmetod utan regelbunden förnyelse av testlösningen under testet.

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

Endpoint: den allmänna faktor som genom inverkan av en testkemikalie förändras jämfört med ett kontrollprov utan testkemikalie. I det aktuella testet är endpointen tillväxthämning, som kan uttryckas med olika responsvariabler baserade på en eller flera mätvariabler.

Testmedium: syntetiskt odlingsmedium i vilket testplantorna växer när de exponeras för testkemikalien. Testkemikalien är vanligen löst i testmediet.

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

Producerad mängd biomassa: värdet på en mätvariabel i slutet av exponeringstiden minus motsvarande värde i början av exponeringstiden. Obs: Om tillväxtmönstret för oexponerade organismer är exponentiellt minskar responsvariabler som är baserade på producerad mängd biomassa under testets varaktighet.
